

TESIS DOCTORAL

**FUNCIONES SINÁPTICAS DE LAS PROTEÍNAS
FIJADORAS DE CALCIO FRECUENINAS.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Jesús Rafael Romero Pozuelo
Madrid, Febrero 2007**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FUNCIONES SINÁPTICAS DE LAS PROTEÍNAS
FIJADORAS DE CALCIO FRECUENINAS

Memoria que presenta, para optar al grado de
Doctor, el licenciado en Bioquímica
Jesús Rafael Romero Pozuelo

Director: **Alberto Ferrús Gamero**
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Febrero de 2007

Esta tesis ha sido realizada gracias a la concesión a Jesús Rafael Romero Pozuelo de una Beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología y a los proyectos de investigación del Ministerio de Educación y Ciencia # BMC2003/05051 y # BFU2006-10180/BMC.

A Raquel
A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Durante la realización de este trabajo ha habido mucha gente que bien a nivel profesional o personal han contribuido y me han ayudado, haciendo posible su realización. Para mí la tesis no es sólo este libro, sino que es cada minuto de estos seis años compartidos con compañeros, colegas, amigos y familia dentro y fuera del labo. Así que, y ya que en las próximas ciento y pico páginas hablo únicamente de resultados y trabajo, me tomo este par para daros las gracias:

A mi director de tesis, muchas gracias Alberto por el apoyo y confianza mostrados durante este tiempo y por proporcionarme siempre los medios necesarios para llevar a cabo el trabajo.

A todos mis compañeros actuales y pasados del laboratorio C-12: Jean-Marc, Mari Cruz, Alfonso, Mari Carmen, Clemen, Rodri, Asa, Vin, Citlali, Angel, Ben, Alex, Bea, Sheila, Francesca y Alejandra, gracias a todos porque habiendo pasado buenos y malos momentos juntos siempre me habeis ayudado cuando lo he necesitado. Ah!, también gracias Jean-Marc por convencerme para entrar en el labo... a Alfonso, por su entusiasmo y buen rollo en los mejores, y sobre todo en los “menos mejores” momentos...a Bea por su ayuda con el comportamiento larvario...a Citlali y Mari Carmen por echar una mano siempre que la he necesitado... a Rodri, por su ayuda al microscopio electrónico y enseñarme aquello de la “frialdad del dato”... a Ben por su ayuda informática durante la escritura.

A Carmen por su excelente ayuda en el microscopio confocal.

Al laboratorio de Flora de Pablo y especialmente a Alicia por su ayuda con las PCRs cuantitativas.

Al laboratorio de Acaimo. A Ana y Pedro por enseñarme a hacer las tinciones de ovarios que aunque no se incluyen aquí, algún día verán la luz.

A Miguel Manzanares y Ignacio Marín por su ayuda con las comparaciones de secuencias via mail o *in situ*.

Al labo “de enfrente” (de Javier y Pilar), especialmente a María y Elena por su ayuda siempre eficaz con la purificación de los anticuerpos y el mundo de las proteínas, sois las vecinas perfectas!

A todos los compañeros del Instituto Cajal que también han aportado con alguna enzima rara que no encontraba en mi labo, charla, café, cerveza o hasta partidos de basket o fútbol haciendo más llevadero este tiempo.

A todos los miembros del laboratorio de Harold Atwood, especialmente a Harold y a Jeff, por su excelente colaboración en este trabajo y su ayuda durante mi estancia en Toronto. A Una por enseñarme a registrar y tener la paciencia de resolver mis meteduras de pata. A Leo, Martin, Marianne, Sabrina, Jason, Maulik y Bala por hacer de mi estancia en su labo una experiencia estupenda.

A Amsale, Hiwote, Kal y Josh, por ocuparse de nosotros durante el tiempo en Toronto, por su amistad y los TCD!!

A mis amigos del Dpto. de Bioquímica de Medicina, a Juan, Vicky, Carlos, Susana, Cristina, y en realidad a todo el labo de Marga, por las barbacoas, marujeos, cervecitas y demás.

A todos mis tíos y primos, porque siempre quieren saber qué hacemos con el cerebro de las moscas en el labo... porque su interés es suficiente para darnos ánimos y continuar en esto.

A Isabel, Hipolito, Ester y Peter por ser los mejores “otros” padres y hermanos.

A mis hermanos; Mari Viky, Fernando, Peri, Esther, Mari Mar, Javi, Juangui y Amaya.

Por estar siempre que os necesitamos, por aguantarme estos meses de escritura.

A mis padres por entenderme y aceptar mi dedicación a este trabajo, por ser mi ejemplo y haberme ayudado siempre a cumplir mis sueños.

A Raquel porque sólo tú sabes lo que ha costado.

ÍNDICE

RESUMEN/SUMMARY	1
RESUMEN.....	2
SUMMARY	3
ABREVIATURAS.....	4
<u>INTRODUCCIÓN.....</u>	<u>5</u>
1. LA UNIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA.....	6
2. ESTRUCTURA DE LA SINAPSIS	8
3. LIBERACIÓN SINÁPTICA.	9
3.1 Propiedades de la liberación de neurotransmisor.	10
3.2 Ciclo de las vesículas sinápticas	11
3.3 Mecanismo de exocitosis.	11
3.4 Papel del Ca ²⁺ en la liberación sináptica.	13
4. SENSORES DE CALCIO NEURONALES.....	14
4.1 Los motivos de unión a Ca ²⁺ tipo manos-EF	14
4.2 La familia NCS.	15
4.3 Miristoilización y localización subcelular de las proteínas NCS.	17
5. FREQUENINA/NCS1.....	17
5.1 Localización de Frq/NCS1.	18
5.2 Estructura de Frq/NCS1.	20
5.3 Frq/NCS1 y la regulación de la liberación sináptica.	21
5.4 Frq/NCS1 y la regulación de canales iónicos	23
5.5 Interacciones moleculares de Frq/NCS1	24
<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>26</u>
OBJETIVOS.....	27
<u>MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>28</u>
1. ESTIRPES DE <i>DROSOPHILA</i>	29
2. GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GÉNICAS.	30
2.1 Vectores de clonaje.	30

2.2 Vectores usados para la generación de líneas transgénicas.	30
2.3 Construcciones generadas para transfección en células Schneider2 (S2).	31
2.4 Construcciones generadas para usar con el sistema UAS/GAL4.	31
3. TRANSFORMACIÓN EN LA LÍNEA GERMINAL	33
4. RT-PCR CUANTITATIVA	33
4.1 Extracción de RNA.	34
4.2 Reacción de retrotranscripción (RT).	34
4.3 PCR a Tiempo Real.	34
5. HIBRIDACIÓN DE RNAS UNIDOS A MEMBRANA (NORTHERN-BLOT)	36
5.1 Construcciones de sondas para en ensayos de Northern-blot.	36
5.2 Northern-blot.	36
6. GENERACIÓN DEL ANTICUERPO CONTRA FRQ.....	37
7. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA (WESTERN BLOT)	37
8. HIBRIDACIONES DE RNA <i>IN SITU</i>	38
9. INMUNO-HISTOQUÍMICA.....	38
9.1 Inmunotinciones de células S2. Células Schneider2 (S2) fueron crecidas hasta el 80% de confluencia y transfectadas con las construcciones pCH2-myc-Frq1 y pCH2-myc-Frq2 usando Lipofectamine Transfection Reagent según las instrucciones del fabricante (Invitrogen).	38
9.2 Inmunotinciones de las NMJ larvarias.	39
9.3 Cuantificación del área de la unión neuromuscular.	39
9.4 Cuantificación del número de sinápsis.	39
10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	40
12. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS	41
11. ELECTROFISIOLOGÍA.....	41
11.1 Registros intracelulares de célula completa.	42
11.2 Registros focales extracelulares.	42
11.3 Carga de los péptidos DN en motoneuronas.	43
13. ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO	43
13.1 Aprendizaje asociativo en larvas.	43
13.2 Comportamiento locomotor en adultos: Arena de Buridan.	45

RESULTADOS.....47

1. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES <i>FRQ1</i> Y <i>FRQ2</i>	48
1.1 frq es un gen duplicado en <i>Drosophila</i> .	48
1.2 Conservación evolutiva de Frq1 y Frq2.	50
2. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>FRQ1</i> Y <i>FRQ2</i>	52

2.1 Estudio del patrón temporal de la expresión de frq1 y frq2.	52
2.2 Estudio del patrón espacial de expresión de frq1 y frq2.	55
2.3 Localización subcelular de Frq1 y Frq2.	57
3. GENERACIÓN DE MUTANTES DE EXCESO Y FALTA DE FUNCIÓN	57
3.1 Generación de mutantes de exceso de función de los genes frq1 y frq2.	59
3.2 Generación de mutantes de falta de función de frq1 y frq2.	60
4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS.	63
4.1 Cuantificación de los niveles de expresión de frq1 o frq2 en las distintas líneas mediante QRT-PCR.	63
4.2 Cuantificación de los niveles de frq1 y frq2 en las cepas V7 y PBac{(w+), frq2[f06131]}.	64
4.3 Cuantificación de los niveles de las proteínas Frq1 o Frq2 en las líneas transgénicas.	65
5. FENOTIPOS DE EXCESO Y ATENUACIÓN FUNCIONAL DE <i>FRQ1</i> Y <i>FRQ2</i>	66
5.1 Análisis morfológico.	67
5.2 Análisis fisiológico.	69
5.2a Registros intracelulares.	69
5.2b Registros extracelulares.....	72
5.2c Estimación de la liberación de neurotransmisor por sinapsis.....	72
5.3 Efectos de Frq1 y Frq2 en el número total de sinapsis.	74
6. GENERACIÓN DE MUTANTES DOMINANTES-NEGATIVOS DE <i>FRQ1</i> Y <i>FRQ2</i> Y ANÁLISIS DE SUS FENOTIPOS.	75
6.1 El péptido NCS1 ^{DN} de mamíferos afecta la liberación de neurotransmisor en <i>Drosophila</i> .	75
6.2 Generación de líneas DN-Frq1 y DN-Frq2.	77
6.3 Análisis morfológico de las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2.	77
6.4 Análisis fisiológico de la expresión crónica de los DN-Frq1 y DN-Frq2.	79
6.4a Registros intracelulares de las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2.....	79
6.4b Registros extracelulares de las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2.....	81
6.4c Estimación de la liberación por sinapsis en las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2.....	82
7. EFECTO DE LA APLICACIÓN AGUDA DE <i>FRQ</i> ^{DN} SOBRE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR.	83
8. ANÁLISIS DE INTERACCIONES GENÉTICAS	85
8.1 Interacción entre Frq y Fosfatidil-Inositol-4-Quinasa- β (PI-4K β).	85
8.2 Interacción de Frq con los canales de Ca ²⁺ sensibles a voltaje.	86
8.3 Interacción de Frq con los canales de K ⁺ de tipo A.	87
8.4 Interacción de Frq con la maquinaria de liberación de vesículas sinápticas.	88
9. FENOTIPOS DE COMPORTAMIENTO.....	89
9.1 Efectos de Frq1 y Frq2 en el aprendizaje asociativo larvario.	89
9.2 Efectos de Frq1 y Frq2 en el comportamiento locomotor de adultos.	92

DISCUSIÓN..... 94

1. MANTENIMIENTO DE LA DUPLICACIÓN DE FRQ.	95
2. FRQ1 Y FRQ2 REGULAN LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR.	97
2.1 Frq1 y Frq2 como reguladores del tráfico vesicular.	98
2.2 Frq1 y Frq2 como reguladores de la maquinaria de exocitosis.	99
2.3 Frq1 y Frq2 como reguladores de la actividad de canales iónicos.	100
3. FRQ1 Y FRQ2 REGULAN LA MORFOLOGÍA SINÁPTICA.	101

CONCLUSIONES..... 104

BIBLIOGRAFÍA..... 107

RESUMEN/SUMMARY

RESUMEN

Frecuenina (Frq) y su homólogo en mamíferos, *Neuronal Calcium Sensor 1* (NCS1), son proteínas de unión a Ca^{2+} que se expresan en el sistema nervioso. Su sobreexpresión produce el incremento de la liberación de neurotransmisor. En este trabajo se ha identificado un segundo gen para Frq en *Drosophila*. Este gen codifica una proteína con un 95% de identidad de secuencia a la Frq descrita originalmente. Ambos genes (*frq1* y *frq2*) presentan un grado excepcionalmente alto de conservación tanto entre ellos como sus homólogos en todas las especies analizadas. Los dos genes se expresan específicamente en el sistema nervioso central y en los mismos estadios del desarrollo, sin embargo se diferencian en sus niveles de expresión. Para estudiar las consecuencias del exceso o la falta funcional de Frq1 o Frq2 hemos usado el sistema UAS/Gal4. Demostramos que la sobreexpresión de Frq1 o Frq2 en motoneuronas larvarias, incrementa la liberación de neurotransmisor por sinapsis. Paralelamente, se produce una reducción en el número de botones de tipo Is. En cuanto a los efectos de la falta de función, la reducción de un 60% en las cantidades totales de ambas proteínas mediante el uso de RNAi no produce alteraciones funcionales ni morfológicas. Sin embargo la expresión en las mismas motoneuronas de los dominantes negativos (DN) de Frq1 y Frq2 o el tratamiento con los péptidos sintéticos de *Drosophila* Frq^{DN} (o de mamíferos NCS1^{DN}), produce una drástica reducción en la liberación de neurotransmisor por sinapsis así como un incremento del número de botones de tipo Is. La consistencia entre los fenotipos de exceso y falta de función nos permite concluir que las Frqs regulan la liberación basal de neurotransmisor así como la formación de botones de tipo Is. Por último, los fenotipos celulares observados tienen consecuencias funcionales en el comportamiento ya que los niveles de Frq1 y Frq2 modulan la actividad locomotora de adultos.

SUMMARY

Frequenin (Frq) and its mammalian homologue, Neuronal Calcium Sensor 1 (NCS1), are Ca^{2+} -binding proteins expressed in the central nervous system mainly. When overexpressed, they enhance neurotransmitter release. Here, we find a second Frq-encoding gene in *Drosophila*. This gene encodes a 95% identical protein to the previously described Frq. Both genes (*frq1* and *frq2*) show an unusual conservation between them as well as with respect to the corresponding homologues in all species analyzed. Both genes are expressed in the central nervous system during similar developmental stages. However, they differ in their quantitative levels of expression. We studied the effects of the excess and loss of function by using the UAS/Gal4 system. We show that overexpression of Frq1 or Frq2 in larval motoneurons increase the release per synapse, but reduce the number of type I boutons. Concerning Frq loss-of-function phenotypes, reduction of both proteins levels by 60% using the RNAi construct does not modify the synaptic responses nor the neuronal morphology. However, the expression of dominant negative (DN) constructs for Frq1 or Frq2 or acute incubation with synthetic fly Frq^{DN} (or mammalian NCS1^{DN}) peptides, drastically reduce release per synapse and increase the number of type I boutons. The coherence between excess and loss-of-function phenotypes allows to conclude that Frqs modulate neurotransmitter release and type I bouton development. Finally, cellular phenotypes have functional effects in behaviour, since Frq1 and Frq2 levels modulate locomotor activity.

ABREVIATURAS

DN: Dominante negativo

EJC: (*Excitatory Junctional Currents*) Corrientes post-sinápticas excitatorias.

EJP: (*Excitatory Junctional Potentials*) Potenciales post-sinápticos excitatorios.

Glu: Glutamato

mEJC: (*miniature Excitatory Junctional Currents*) Corrientes postsinápticas espontáneas en miniatura.

mEJP: (*miniature Excitatory Junctional Potentials*) Potenciales postsinápticos espontáneos en miniatura.

MΩ: Mega ohmio.

NCS: Sensores de calcio neuronales.

NMJ: Unión neuromuscular.

ORF: (*Open Reading Frame*) Fase de lectura abierta.

PA: Potencial de acción.

QRT-PCR: RT-PCR cuantitativa.

SNC: Sistema nervioso central.

Syb: Sinaptobrevina.

Syn: Sintaxina.

Syt: Sinaptotagmina.

TGN: Red Trans del aparato de Golgi.

V7: Traslocación cromosómica T(X;Y)V7

ZA: Zona activa.

INTRODUCCIÓN

1. LA UNIÓN NEUROMUSCULAR LARVARIA

El sistema nervioso central (SNC) constituye un tejido apropiado para estudiar la función de genes en procesos como el desarrollo axonal o la transmisión sináptica. En este trabajo usamos la unión neuromuscular (NMJ) de la larva de tercer estadio como sistema experimental. El conjunto de NMJs constituyen un sistema neuromuscular segmental y bilateralmente simétrico. En los segmentos abdominales A2-A7, este sistema consta de 30 músculos inervados por al menos 32 motoneuronas por hemisegmento (Hoang and Chiba, 2001). Durante el desarrollo, estas motoneuronas extienden sus axones desde el ganglio ventral formando los nervios transversales, segmentales e intersegmentales, hasta contactar con sus dianas (**Fig. I-1**). Cada músculo abdominal está inervado por uno o varios axones bien identificados (Hoang and Chiba, 2001). En nuestro caso hemos trabajado en las NMJ de las fibras musculares 6 y 7 del segmento abdominal tercero (A3). Estas fibras son inervadas por dos motoneuronas distintas; MN6/7-Ib y MNSNb/d-Is, que tienen propiedades morfológicas y fisiológicas específicas (Atwood et al., 1993; Hoang and Chiba, 2001).

De forma general, todas las motoneuronas larvarias se caracterizan por formar unos ensanchamientos de la membrana axónica, en donde se acumulan las sinápsis, conocidos como varicosidades o botones. La motoneurona MN6/7-Ib inerva únicamente las fibras musculares 6 y 7, forma ramificaciones cortas y botones sinápticos de tipo Ib. Con respecto a los de tipo Is (ver más abajo), los Ib tienen un diámetro entre 3 y 6 μm , son menos numerosos y generan potenciales excitadores postsinápticos (EPSPs o EJPs) de menor amplitud. La motoneurona MNSNb/d-Is, inerva todas las fibras musculares longitudinales ventrales (6,7,12,13,14,15,16 y 30), forma ramificaciones largas y botones de tipo Is. Éstos son de menor tamaño (2-4 μm de diametro), más numerosos que los de tipo Ib y generan EJPs de mayor amplitud.

El neurotransmisor más abundante en la NMJ larvaria es el Glutamato (Glu) (Johansen et al., 1989). En su ultraestructura, ambos tipos de botones presentan un gran número de vesículas claras (*Small Clear Vesicles; SCV*), que contienen Glu y, eventualmente, se pueden apreciar algunas vesículas grandes densas (*Large Dense Vesicles; LDV*), que contienen neuropéptidos. Las NMJ están totalmente rodeadas por la membrana de la célula muscular. Justo por debajo de esta membrana se localiza el

retículo subsináptico, que actúa como reservorio intracelular de Ca^{2+} en la fibra muscular (**Fig. I-1C**).

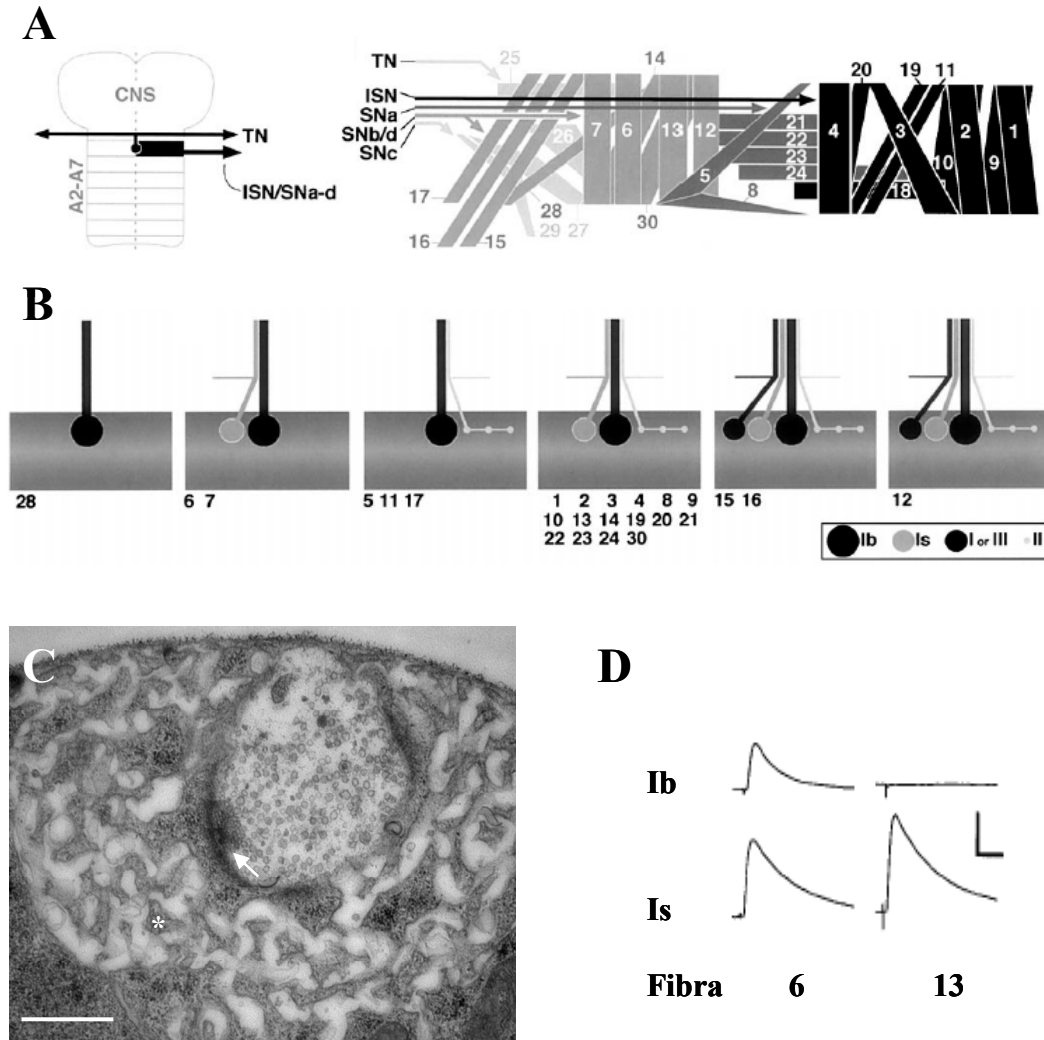


Figura I-1. La unión neuromuscular larvaria. **A)** Esquema del SNC y de los músculos de la pared larvaria. El segundo segmento abdominal está sombreado en negro. Cada segmento del SNC tiene una salida dorsal en la línea media, de donde parte el nervio transversal (TN), y otra salida lateral de donde parten los nervios segmentales e intersegmentales (SN y ISN, respectivamente). Los 30 músculos que forman cada hemisegmento de la pared larvaria, son innervados por las motoneuronas que forman estos nervios. (Hoang and Chiba 2001). **B)** Representación de la innervación recibida por cada músculo larvario. Un único músculo puede recibir innervación de hasta cuatro motoneuronas distintas nombradas como Ib, Is, II y III. (Hoang and Chiba 2001). **C)** Micrografía electrónica de un botón de tipo I innervando la fibra muscular 6. Barra = 500nm. (*) = retículo subsináptico. Flecha = zona activa. **D)** Potenciales postsinápticos evocados (EJPs) producidos por la liberación de neurotransmisor desde la motoneurona MN-Ib y MNSN-Is. (Atwood et al. 1993).

Las diferencias ultraestructurales existentes entre ambos tipos de botones son principalmente cuantitativas; los de tipo Ib presentan un mayor número de sinapsis, vesículas, mitocondrias y un retículo subsináptico más desarrollado que los de tipo Is. La amplia descripción existente de la morfología y fisiología de estas motoneuronas las hacen idóneas para caracterizar funcionalmente moléculas involucradas en la transmisión sináptica.

2. ESTRUCTURA DE LA SINAPSIS

El término sinapsis fue acuñado por Ch. Sherrington a finales del siglo XIX para definir el lugar de contacto entre dos neuronas en donde se lleva a cabo la transmisión del impulso nervioso. Por el criterio ultra-estructural, la sinapsis se define como el lugar de contacto especializado entre dos neuronas y comprende: las zonas de membrana electrodensas pre y post sinápticas y las estructuras especializadas necesarias para la liberación vesicular. La zona presináptica en donde se produce la liberación se denomina zona activa (ZA). En ellas se acumulan moléculas de adhesión celular como Fasciclina-II, que ayudan mediante su interacción con moléculas del lado postsináptico al posicionamiento correcto de ambas membranas. También se localizan los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y distintas proteínas de la citomatrix (ERCs, Piccolo, Basson, RIM1, unc13, etc), que participan en el correcto posicionamiento de la maquinaria de liberación y de las vesículas sinápticas cerca de los canales de Ca^{2+} (Sudhof, 2004; Zhai and Bellen, 2004). Todos estos componentes deben estar situados muy cerca dado el escaso tiempo que tarda el Ca^{2+} en activar la fusión vesicular (200 μs). La estructura de la ZA depende de la especie (Zhai and Bellen, 2004). Así, en la NMJ de rana los canales de Ca^{2+} forman dos hileras, sobre las que se anclan las vesículas sinápticas (Harlow et al., 2001) (**Fig. I-2A-C**). En *Drosophila*, las ZA presentan una estructura característica en forma de T (**Fig. I-2DF**). Uno de los componentes de las ZA en este organismo es Bruchpilot (Brp), homólogo a las proteínas humanas ELKS/CAST/ERC. Esta proteína se ha caracterizado recientemente como un componente de la citomatrix de las ZA cuya función es necesaria para el correcto anclaje de los canales de Ca^{2+} y la liberación evocada de vesículas (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006).

3. LIBERACIÓN SINÁPTICA.

Los terminales nerviosos son lugares de secreción vesicular que deben soportar sucesivas rondas de liberación. La llegada del potencial de acción (PA) al terminal presináptico provoca la despolarización de la membrana y la activación de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje. La apertura de estos canales produce la entrada de Ca^{2+} en el

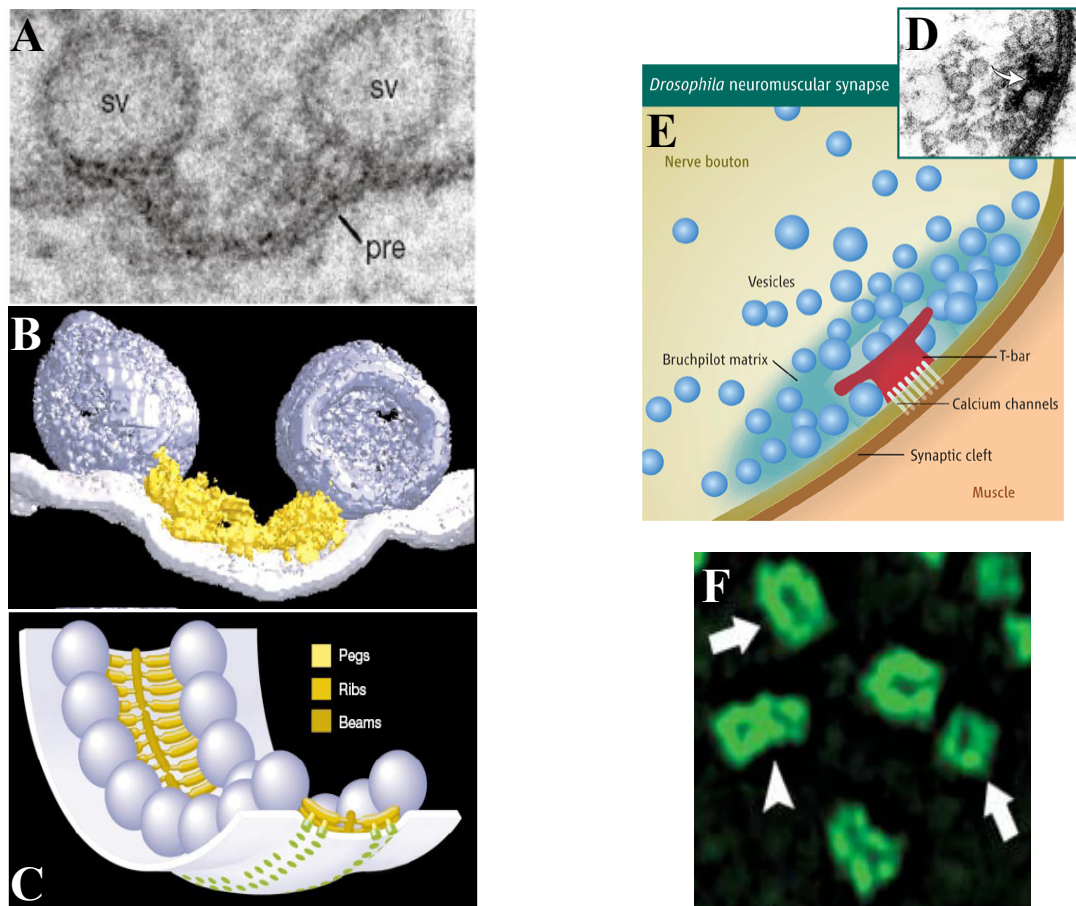


Figura I-2. Estructura de la zona activa (ZA). A-C) ZA de sinapsis de rana (modificado de Harlow et al. 2001) A) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de la ZA de la sinapsis de la NMJ de rana. La imagen corresponde a un plano transversal de la ZA donde se aprecia las vesículas sinápticas ancladas (vs) y la membrana presináptica (pre). B) Reconstrucción de imágenes seriadas, 15 nm en dirección transversal, de microscopía electrónica. C) Esquema correspondiente a 1-2 μm de cortes transversales de la misma sinapsis que AyB. Azul = vesículas sinápticas, amarillo = proteínas de citomatrix de la ZA, blanco= membrana presináptica, verde= canales de calcio. D-F) ZA de sinápsis de *Drosophila* (modificado de Atwood 2006 y Kittel et al. 2006). D-E) Imagen de microscopía electrónica de un corte transversal de la ZA de una sinapsis en la NMJ de *Drosophila* y esquema representativo de la misma. Nótese la estructura en T, formada por material electrodenso, donde se anclan las vesículas sinápticas. Bruchpilot, una proteína de la citomatrix de la zona activa, se distribuye alrededor de la estructura en T. Obsérvese la distribución en forma de anillo de esta proteína mediante el marcaje usando el anticuerpo nc82 (F).

terminal, lo que estimula la exocitosis de las vesículas sinápticas que se encuentran preparadas para la liberación. Posteriormente, estas vesículas deben ser endocitadas o recicladas y rellenas de neurotransmisor para una nueva ronda de liberación. La fusión de las vesículas provoca la liberación de neurotransmisor a la hendidura sináptica lo que activa los receptores postsinápticos. El neurotransmisor más abundante en la NMJ de *Drosophila* es el Glu, y su liberación produce la activación de los receptores ionotrópicos de Glu en la membrana postsináptica (Qin et al., 2005; Schuster et al., 1991). Sin embargo, la mayoría de los PA que llegan al terminal no resultan en liberación vesicular. En la sinapsis del Cáliz de Held únicamente el 10-20% de los PA lo logran (Sudhof, 2004), aunque esta cantidad varía según el tipo de sinapsis. La relación entre PA que llegan al terminal y la respuesta que se produce, está regulada por señales intra o extracelulares, así como por el propio estado de activación de la neurona.

3.1 Propiedades de la liberación de neurotransmisor. El modelo cuántico explica el modo en el que se libera neurotransmisor por el terminal sináptico (Del Castillo and Katz, 1954; Fatt and Katz, 1952). La secreción de neurotransmisor ocurre en paquetes multimoleculares denominados *quanta*. Las neuronas en reposo presentan una baja probabilidad de liberación en forma de eventos espontáneos de exocitosis, lo que se refleja en los registros electrofisiológicos como corrientes postsinápticas o variaciones en el potencial de membrana en miniatura (*End-Plate Synaptic Current Miniatures*; *mEPSC/Excitatory Junctional Current Miniatures*; *mEJC* o *End-Plate Synaptic Potential Miniatures*; *mEPSP/Excitatory Junctional Potentials Miniatures*; *mEJPs* respectivamente) (Katz and Miledi, 1969). Cada uno de estos eventos se produce por la liberación de un *quantum* que se corresponde con el contenido de una vesícula sináptica. Tras la llegada del potencial de acción al terminal, se produce la liberación sincrónica de uno a varios cientos de estos *quanta*, dependiendo del tipo de sinapsis. Esta liberación se refleja en los registros electrofisiológicos como corrientes postsinápticas o cambios en el potencial de membrana evocados (*EPSC/EJCs* ó *EPSPs/EJPs* respectivamente). El número de *quanta* que se liberan en respuesta a un estímulo; *mean quantal content* o *m* se puede calcular experimentalmente si se registra un número alto de eventos espontáneos (*mEJP*) y evocados (*EJP*) de liberación, mediante la ecuación: media de la amplitud de los *EJP* / media de la amplitud de los

mEJP. De igual forma, calculando el valor medio de la amplitud en las respuestas postsinápticas espontáneas (mEJP) obtenemos el *quantal size* o tamaño medio de la respuesta provocada por la liberación de una única vesícula. En general, los cambios que afectan al *quantal content* reflejan la modulación presináptica, alterando la cantidad de vesículas liberadas por estímulo. Por el contrario, los cambios en el *quantal size* reflejan cambios en la parte postsináptica, como son la actividad o el número de receptores de neurotransmisor.

3.2 Ciclo de las vesículas sinápticas. Todas las funciones presinápticas, dependen directa o indirectamente del ciclo de exo/endocitosis que sufren las vesículas. Este ciclo se representa en la **Fig. I-3A** y consta de las siguientes fases (ver Sudhof 2004 para una revisión): primero las vesículas son rellenadas de neurotransmisor mediante transportadores específicos (paso 1) y se agrupan cerca de las zonas activas (paso 2). Posteriormente las vesículas contactan con las zonas activas (*docking*; paso 3) y sufren un proceso denominado *priming* por el que adquieren la competencia para fusionarse con la membrana plasmática en respuesta a Ca^{2+} (paso 4). Tras la fusión de la vesícula con la membrana (paso 5), éstas se pueden reciclar mediante tres rutas distintas; pueden no separarse de las zonas activas, donde se reacidifican y se vuelven a cargar de neurotransmisor en un proceso conocido como *kiss and stay* (paso 6), se pueden reciclar localmente, separándose de las zonas activas, volviendo a los pasos 1 y 2 en un proceso conocido como *kiss and run* (paso 7), o pueden entrar en la vía de endocitosis mediada por clatrina (paso 8) en donde las vesículas se reciclan directamente (volviendo al paso 1) o mediante la vía endosomal (paso 9).

3.3 Mecanismo de exocitosis. La maquinaria mínima necesaria para la fusión de las vesículas a la membrana esta formada por el complejo compuesto por las proteínas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor*) y Sinaptotagmina (Syt). El complejo SNARE esta formado por la proteína de membrana plasmática Sintaxina (Syn), que mediante la unión con SNAP-25 interacciona con la membrana de la vesícula sináptica a través de la Sinaptobrevina (Syb) (Richmond and Broadie, 2002; Rizo et al., 2006). Por otro lado, Syt actúa como sensor del aumento de Ca^{2+} intracelular, cooperando con el complejo SNARE para acelerar la fusión de las membranas vesicular y plasmática, produciendo así la liberación de neurotransmisor (**Fig. I-3B**). La importancia del sensor de Ca^{2+} Syt en la liberación rápida viene

resaltada por el hecho de que su falta produce una dramática reducción de la liberación evocada. Sin embargo, ésta no se elimina por completo, sugiriendo que aunque su función es necesaria para una neurotransmisión normal, no es absolutamente esencial para la exocitosis vesicular (Broadie et al., 1994; Marek and Davis, 2002).

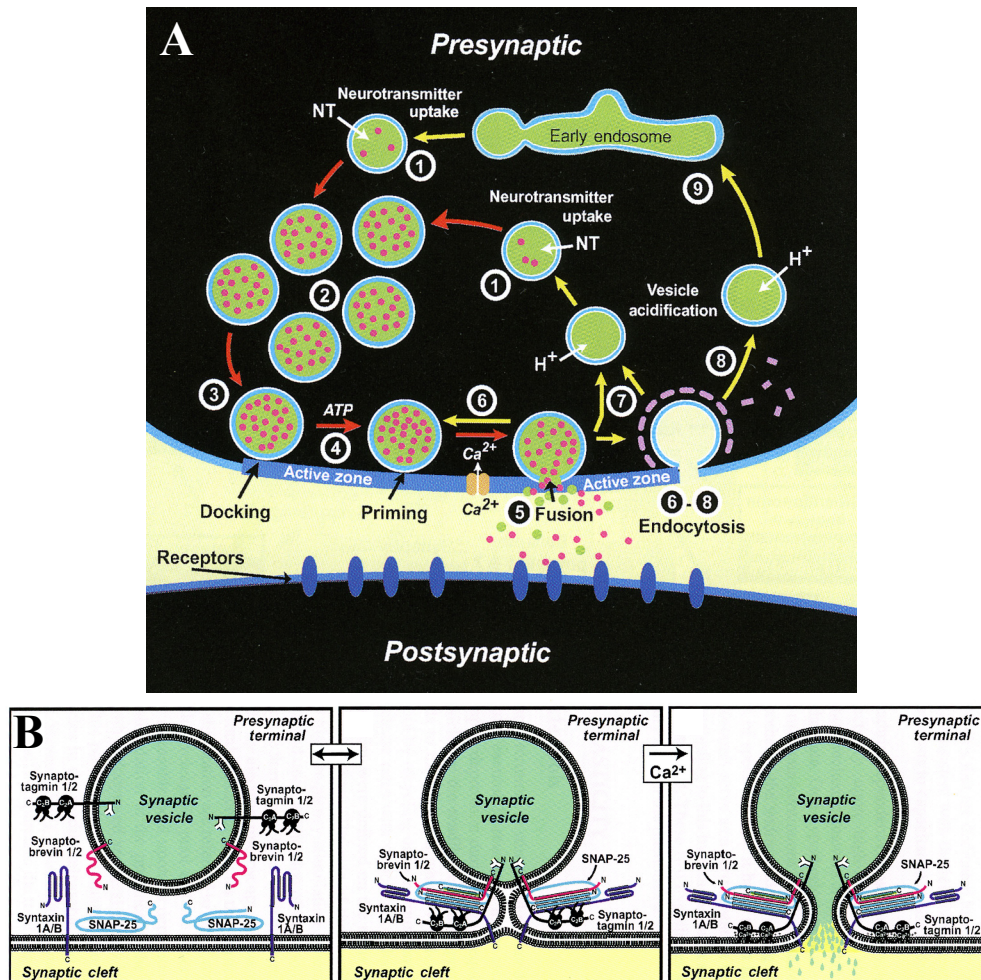


Figura I-3. Ciclo vesicular. A) Liberación de neurotransmisor (ver texto principal). B) Modelo funcional de las proteínas SNARE y la Sinaptotagmina en la fusión vesicular. Durante el proceso de *priming* (paneles izquierdo y central), se forma el complejo SNARE, lo que fuerza la aproximación de las membranas plasmática y vesicular. Esto resulta en la formación de un intermediario inestable que tras la entrada de Ca^{2+} se desestabiliza, debido a la inserción de los dominios C2 de la Sinaptotagmina en los fosfolípidos de la membrana plasmática (panel derecho). Tomado de Südhof, 2004.

Además de esta maquinaria mínima, en los últimos años se han identificado nuevas proteínas con funciones esenciales para la liberación vesicular (Richmond and Broadie, 2002; Südhof, 2004). Así, moléculas como Rab3, Unc13, Unc18 o RIM, que actúan en el proceso de *priming*, son cruciales para la correcta fusión vesicular. Otras

como la ATPasa NSF (*N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein*) actúan en el desensamblaje del complejo SNARE tras la fusión vesicular. Alelos hipomorfos de NSF producen la acumulación de estos complejos y la parálisis, mientras que alelos nulos son letales (Littleton et al., 2001). Cystein String Protein (CSP) es una chaperona capaz de reclutar a Hsc70, estabilizando los complejos proteicos que participan en la exocitosis y regulando así la sensibilidad al Ca^{2+} de la liberación (Bronk et al., 2001; Evans et al., 2003). Así pues, para que la liberación de neurotransmisor ocurra de forma rápida y controlada en respuesta a un estímulo, es necesaria la colaboración de numerosas moléculas que interaccionan y regulan el complejo formado por la vesícula, las proteínas SNARE, la Syt y la membrana plasmática.

3.4 Papel del Ca^{2+} en la liberación sináptica. Una característica de la liberación de neurotransmisor es el *retraso sináptico*, es decir, el tiempo que transcurre desde la llegada del potencial de acción al terminal presináptico hasta la respuesta en la célula postsináptica. Este tiempo varía según las condiciones de experimentación (como la temperatura) y el sistema donde se realizan los registros; por ejemplo a temperatura ambiente es de 1 ms en la sinapsis del Cáliz de Held (Meinrenken et al., 2003), 0,5 ms en la NMJ de rana (Katz and Miledi, 1965) o de 1 ms en la NMJ larvaria de *Drosophila* (Mallart et al., 1991). Parte de este tiempo es necesario para que los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje se abran y produzcan el aumento súbito de la concentración de este ión en el interior del terminal. La otra parte es el necesario para que este aumento de Ca^{2+} dispare la liberación de las vesículas que estaban ancladas y preparadas en la zona activa (*primed vesicles*). En vertebrados, los canales de Ca^{2+} tipo N y P/Q se localizan en la mayoría de las sinapsis, siendo los más importantes para la liberación de neurotransmisor. Los de tipo R lo hacen únicamente en algunas sinapsis y los de tipo L o T no contribuyen a este proceso (Dietrich et al., 2003). Los distintos tipos de canales están formados por combinaciones de subunidades. Poseen una subunidad principal que forma el poro; $\alpha 1$ y varias subunidades accesorias $\beta 1$, $\alpha 2/\delta$ y γ (Catterall, 1998). En *Drosophila*, existen 3 genes que codifican la subunidad α (Littleton and Ganetzky, 2000; Rieckhof et al., 2003); el gen $\alpha 1A$, homólogo a los genes de vertebrados que codifican la subunidad $\alpha 1$ de los canales N y P/Q, el gen $\alpha 1D$ homólogo a la subunidad de canales de tipo L y el $\alpha 1G$ que forma los canales de tipo T. El gen de la subunidad $\alpha 1A$ se denomina *Dmca1A* o *cacophony* (Littleton and Ganetzky, 2000; Smith et al., 1996). Su producto se localiza en las zonas activas de la presinapsis y su función es

esencial para la liberación de neurotransmisor (Kawasaki et al., 2002; Kawasaki et al., 2000a; Kawasaki et al., 2000b; Kawasaki et al., 2004). Se sabe que la concentración de Ca^{2+} que tiene que alcanzar el interior presináptico para que se produzca la liberación es de 5-20 μM , saturándose cuando alcanza valores superiores (Bollmann et al., 2000). Así pues, la liberación de neurotransmisor se dispara por la unión del Ca^{2+} a un sensor de alta afinidad ($K_d = 5\text{-}20\mu\text{M}$).

4. SENSORES DE CALCIO NEURONALES.

Como hemos resaltado anteriormente, el Ca^{2+} juega un papel central en la liberación de neurotransmisor. Además, actúa en múltiples aspectos de la actividad neuronal; desde la regulación rápida de canales, hasta los cambios a largo plazo que ocurren en la transcripción génica. Para realizar esta variedad de señales, es necesaria la existencia de distintas proteínas capaces de unir este catión, pero que se diferencien en la afinidad con la que lo unen, en su localización, y las dianas moleculares sobre las que actúan. La unión de este catión tiene lugar en motivos estructurales específicos como los C_2 , de la Syt (Mackler et al., 2002). Los miembros de la superfamilia de la Calmodulina, por el contrario tienen en común los dominios de unión a Ca^{2+} de tipo *manos-EF*. En el caso de la Calmodulina, se conocen alrededor de 300 efectores distintos a través de los que realiza la multitud de funciones celulares en las que está involucrada (Ikura and Ames, 2006). Algunos miembros de esta superfamilia son la Parvalbúmina, TroponinaC, Miosina, la familia NCS, o la familia S100. En todas las proteínas con motivos de *manos-EF*, la unión a Ca^{2+} provoca un cambio conformacional que produce la exposición de otros motivos estructurales necesarios para la unión a su efector (Capozzi et al., 2006; Ikura and Ames, 2006).

4.1 Los motivos de unión a Ca^{2+} tipo *manos-EF*. Las *manos-EF* se caracterizan por una estructura de tipo α -hélice-lazo- α -hélice, en donde 12-14 aminoácidos forman el lazo donde se une el Ca^{2+} . El nombre de este motivo proviene de la estructura, en forma de los dedos pulgar e índice de la mano, que forman las hélices E y F del sitio de unión a Ca^{2+} en la primera proteína donde se describió; la parvalbúmina (Kretsinger and Nockolds, 1973). La unidad estructural y funcional mínima presente en las proteínas con *manos-EF* está constituida por dos de estos motivos unidos por una secuencia espaciadora de longitud variable (Capozzi et al., 2006).

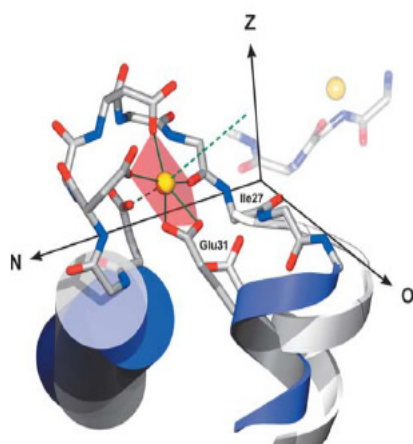
En el motivo canónico de *manos-EF*, el lazo entre las dos α -hélices está formado por 12 aminoácidos. De éstos, los situados en las posiciones x, y, z, -y, -x, -z aportan un oxígeno para la coordinación del catión (**Fig. I-4A-B**). El Glutámico en la posición -z está conservado ya que contribuye con dos oxígenos a la unión con el catión. Así pues, en la mayoría de las proteínas con *manos-EF*, el Ca^{2+} se une por la coordinación de siete oxígenos, aportados por los residuos del lazo, formando una estructura molecular de bipirámide pentagonal (**Fig. I-4B**) (Grabarek, 2006). Además, el residuo central (localizado en posición -y) aporta el oxígeno del carbonilo situado en su cadena principal para la unión del Ca^{2+} . El siguiente aminoácido siempre es hidrofóbico (generalmente Leu, Val o Ile) y forma puentes de hidrógeno con el residuo equivalente del motivo *manos-EF* apareado, contribuyendo a formar una lámina- β pequeña que conecta ambas *manos-EF*. A esta estructura se le ha denominado *EF β -scaffold* y parece ser responsable en gran medida de la respuesta conformacional que sufre la proteína tras la unión del Ca^{2+} (**Fig. I-4C**). Esto, junto con los contactos entre α -hélices y la longitud, estructura y flexibilidad de la secuencia espaciadora entre los distintos dominios de *manos-EF*, confieren las diferencias en la respuesta estructural de la proteína al unir el catión entre los distintos miembros de la familia, permitiendo una amplísima versatilidad funcional.

4.2 La familia NCS. La familia de los sensores de calcio neuronales (NCS) constituye un grupo de aproximadamente 15 genes en humanos, que se caracterizan por su expresión más o menos restringida en el sistema nervioso. Estos genes se pueden agrupar en 5 clases (**Fig. R-4**): La clase A está representada por un sólo miembro; Frequenina (Frq)/ NCS1, el cual se encuentra conservado en todas las especies desde levaduras hasta humanos. La clase B esta formada por las VILIPs (*Visinin-like proteins*), también nombradas como Hipocalcinas y Neurocalcinas, las cuales están conservadas desde *C. elegans* hasta humanos. La clase C, representada por la Recoverina y la clase D, que incluye las GCAPs (*Guanilate-Cyclases-activating proteins*), aparecen conservadas desde anfibios en adelante. Mientras que la clase E, constituida por las KChIPs (*K⁺-channels interacting proteins*), sólo se encuentran representadas a partir de los peces.

A

loop length	protein	starting residue	amino acid sequence									
			incoming helix	Ca ²⁺ -binding loop						exiting helix	linker	
				X	Y	Z	-Y	-X	-Z			
14	calcyclin	4	PLDQAIGLLVAIFHKY	S	G	R	E	G	D	K	H	LTIGSKLQ
14	calbindin D9k	3	PEELKGIFEKY	A	A	K	E	G	D	P	N	FPSLLKGPST
13	osteonectin	207	YNMYIFPVHWQFGQL	D	Q	H	P	I	D	G	Y	APLIPM
12	calmodulin	6	EEQIAEFKEAFSLF	D	K	D	G	D	G	T	I	GQNPT
12	parvalbumin	40	LDDVKKAFYVI	D	Q	D	K	S	G	F	I	SPSARALT
11	calpain EF1	98	EEERQFRKLFVQL	A	G	--	DD	--	M	E	V	RHPDLKTDGFG
12	calpain EF3	168	YLWNNIKKWQGIYKRF	D	T	D	R	S	G	T	I	GFHLN

B



C

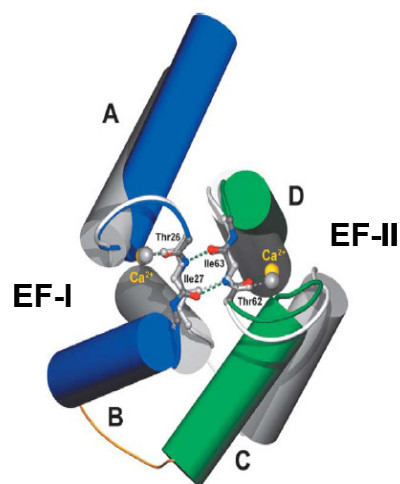


Figura I-4. Los motivos manos-EF. A) Variabilidad de la secuencia de unión a Ca²⁺ en los dominios de *manos-EF*. Los residuos que participan en la unión a Ca²⁺ están en negrita y sombreados. Aquellos que lo hacen aportando el carbonilo de la cadena principal están subrayados. Los residuos sombreados en amarillo, marcan la posición -y más el residuo hidrofóbico siguiente, importantes para el apareamiento de dos *manos-EF*. Rojo = residuos ácidos, azul= residuos básicos. B) Estructura tridimensional del dominio de *manos-EF* de la Calmodulina (con 12 residuos formando el lazo). La posición de las α -hélices cuando esta unido el catión se representa en azul, mientras que en gris se representa superpuesta la posición de las α -hélices en ausencia de calcio. Los residuos que forman el lazo donde se une el Ca²⁺ (en amarillo) están representados en multicolor. Sombreado en rojo se representa la base pentagonal de la estructura bipiramidal formada por la coordinación del catión. C) Representación de la estructura de dos dominios de *manos-EF* unidos por la estructura de pequeña lámina- β . En gris superpuesto al azul y verde se localiza la posición de las α -hélices en ausencia y presencia de calcio respectivamente. Modificado de Grabarek 2006.

Las proteínas NCS presentan una gran diversidad funcional (Burgoyne et al., 2004; Hilfiker, 2003; Zucker, 2003). Así, la Recoverina y GCAPs se expresan exclusivamente en la retina y participan en la fototransducción (Haeseleer et al., 2000; Kawamura, 1994). La Hipocalcina es capaz de inhibir la apoptosis en neuronas mediante su interacción con NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*) (Mercer et al., 2000). Las proteínas KChIP1-4, funcionan como subunidades de los canales de K^+ de tipo A (K_{V4}) (An et al., 2000; Morohashi et al., 2002) mientras que KChIP-3 (también identificado como DREAM o Calsenilina), además de realizar esta función, es capaz de actuar como un regulador transcripcional, uniéndose al DNA y reprimiendo la expresión del gen que codifica Prodinorfina (Carrion et al., 1999), o inducir apoptosis mediante su interacción con la Presenilina generada en neuronas de pacientes de Alzheimer (Buxbaum et al., 1998).

4.3 Miristoilización y localización subcelular de las proteínas NCS. En general, todas las proteínas NCS se localizan en el citosol, en la membrana plasmática y en el *trans*-Golgi (Burgoyne et al., 2004). En algunos casos, como KChIP1, también se ha localizado en vesículas. La localización subcelular de estas proteínas se realiza gracias al dominio de N-Miristoilización que conservan todas las proteínas de la familia NCS excepto KChIP2, KChIP3 y KChIP4. Este dominio consiste en la secuencia MGXXXS/T(K), que permite la adición covalente de un grupo miristoilo por el enzima N-miristoil transferasa. La adición de este ácido graso saturado, permite la interacción de forma débil con la membrana, así como con otras proteínas (Farazi et al., 2001). En los casos de la Recoverina, Hipocalcina, Neurocalcina- δ , VILIP1 y VILIP3, la unión a la membrana se realiza de forma Ca^{2+} -dependiente, de tal forma que la localización de la proteína en el citosol o la membrana se regula por el *Ca^{2+} -Miristoylation Switch* (**Fig. I-5**). Sin embargo, en otros miembros como Frq/NCS1 o KChIP1, no existe este proceso y la unión a la membrana se da de forma Ca^{2+} -independiente, de tal manera que la asociación de estas proteínas con la membrana ocurre incluso en reposo (**Fig. I-5**).

5. FREQUENINA/NCS1.

El gen *frequenina* de *Drosophila* fué el primer miembro que se clonó dentro de la clase A de la familia NCS (Pongs et al., 1993). Tras su identificación en este organismo, se han caracterizado los ortólogos desde lavaduras hasta humanos. En

Drosophila se caracterizó como el gen responsable de los fenotipos de hiperexcitabilidad que mostraban los mutantes *T(X;Y)V7* (V7). Estos mutantes poseen una translocación entre los cromosomas X e Y cuyo punto de ruptura se localiza en la zona 3' del gen *frq*. Como consecuencia de este reordenamiento, se incrementan los niveles de expresión de *frq*, produciendo los fenotipos observados en V7 (Pongs et al., 1993).

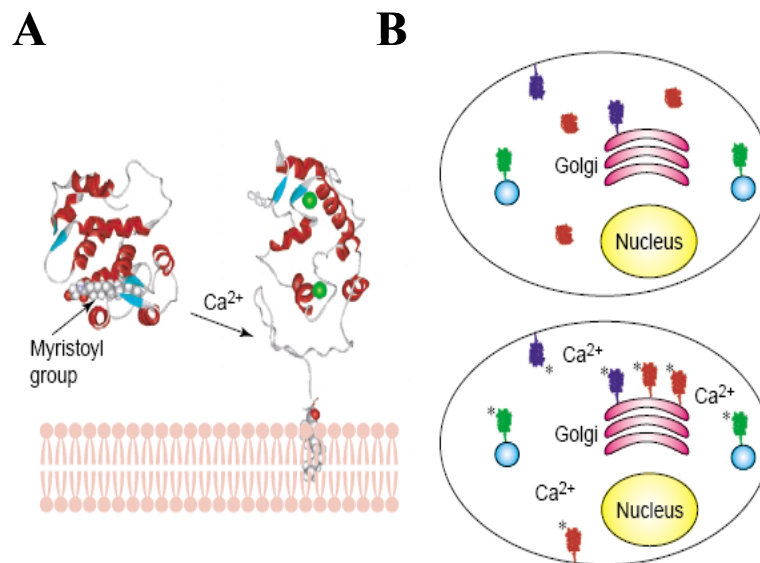


Figura 1-5. Localización subcelular de las proteínas NCS. El interruptor Ca^{2+} -grupo miristoílo (Ca^{2+} -myristoylation-switch). **A)** Estructura de la Recoverina en su forma libre o unida a calcio. La unión de dos iones de calcio (verde) produce el cambio conformacional de la proteína y la extrusión del grupo miristoílo, el cual permite la asociación de la proteína con la membrana. **B)** Esquema de la distribución intracelular de proteínas NCS antes (panel de arriba) y después (panel de abajo) del incremento en los niveles de Ca^{2+} . Frq/NCS1 (azul) y KChIP1 (verde) son ejemplos de la familia NCS que se encuentran asociados a membranas en condiciones de reposo. Mientras que otras proteínas NCS (representadas en rojo) que presentan el Ca^{2+} -myristoylation-switch, se translocan a las membranas en respuesta a aumentos de la concentración de calcio. Tomado de Bourgoyne et al. 2004.

5.1 Localización de Frq/NCS1. En todas las especies donde se ha estudiado, *frq* se expresa de forma ubicua dentro del sistema nervioso (Blasiolo et al., 2005; Braunewell and Gundelfinger, 1999; Martone et al., 1999; Olafsson et al., 1997; Pongs et al., 1993). Además, se ha localizado su expresión en la retina de rata (Reynolds et al., 2001), en células adrenales cromafínicas (McFerran et al., 1998), células PC12 (Koizumi et al., 2002; McFerran et al., 1999), en el corazón de ratón (Nakamura et al., 2003), mastocitos (Kapp-Barnea et al., 2003) y células *Madin-Darby* de riñón canino (Weisz et al., 2000). Así pues, a pesar de la descripción original de esta proteína como

específica de sistema nervioso, estudios posteriores en otras especies han ido revelando la expresión de Frq en otros tejidos y tipos celulares. Estos datos, junto con el descubrimiento de que es esencial para la viabilidad en levaduras (Hendricks et al., 1999), apoyan una función celular más general y posiblemente diversificada. En *Drosophila*, *frq* se expresa en embrión, larva y adultos. Como observamos en la **Fig. I-6**, durante estos estadios la proteína se localiza en el ganglio ventral del sistema nervioso, la unión neuromuscular de la larva y el cerebro del adulto (Pongs et al., 1993).

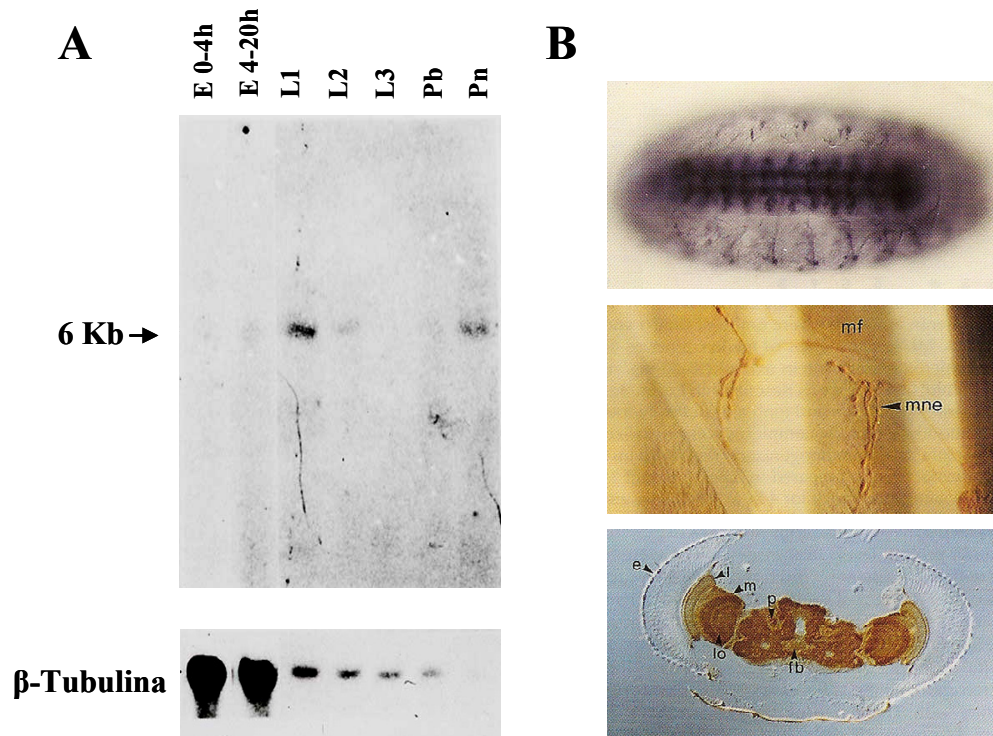


Figura I-6. Patrón de expresión de *frq* en *Drosophila*. **A)** Northern-blot de extractos de Poli(A)+-RNA hibridado con una sonda del cDNA de *frq* (panel de arriba) o con una sonda del cDNA de la β -Tubulina (panel de abajo). E = embrión, L1 = larva de primer estadio, L2 = larva de segundo estadio, L3 = larva de tercer estadio, Pb = pupa temprana, Pn = pupa tardía. **B)** Inmuno-histoquímica de embriones tardíos, de la unión neuromuscular de larvas de tercer estadio y de secciones de cabeza de adultos, teñidos con el anticuerpo anti-Frq. mf = fibra muscular, mne = terminación de la motoneurona, e=ojo, l = lámina, m = médula, lo = complejo lobular, fb = *fan-shaped body*, p = pedúnculo. La parte dorsal del cerebro es la parte inferior de la imagen.

A nivel subcelular, el patrón de localización de Frq/NCS1 se corresponde con el mostrado anteriormente para la familia NCS, encontrándose en el citosol, *trans*-Golgi y la membrana plasmática (Bourne et al., 2001; Chen et al., 2001; Martone et al., 1999; O'Callaghan et al., 2002; Taverna et al., 2002). Además, en células PC-12 se ha visto

que Frq colocaliza con el marcador vesicular Sinaptofisina, sugiriendo que en algunos sistemas puede localizarse en esta estructura (Koizumi et al., 2002).

5.2 Estructura de Frq/NCS1. La estructura tridimensional ha sido obtenida recientemente gracias a la cristalización de la proteína NCS1 de humanos (Bourne et al., 2001). El plegamiento de la molécula es muy similar a la de otros miembros de la familia NCS como Neurocalcina o Recoverina, conservando dos pares de motivos de *manos-EF*.

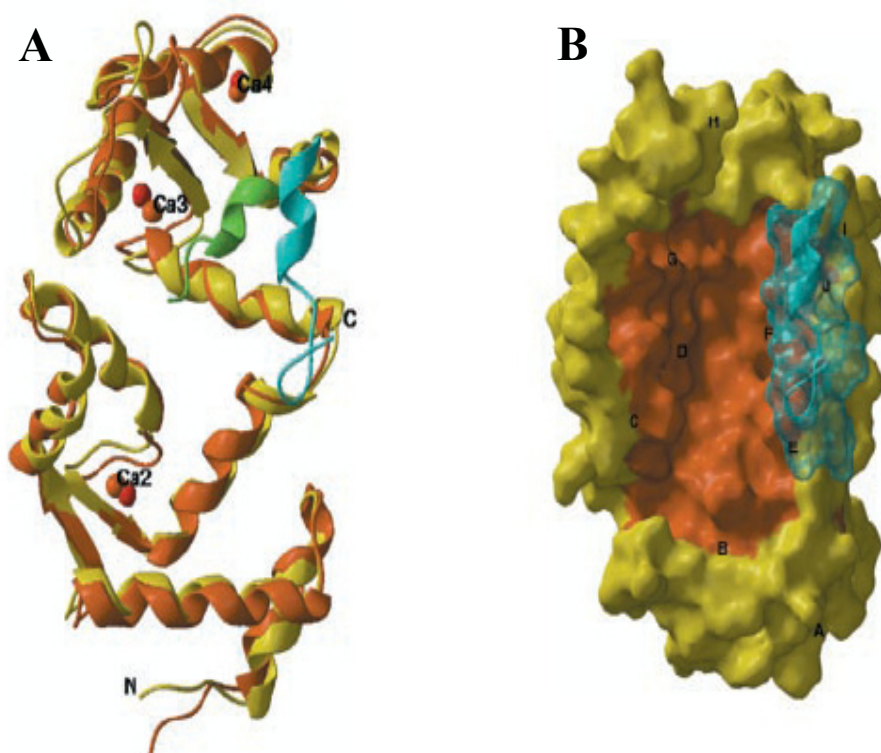


Figura I-7. Comparación de las estructuras terciarias de Frecuenina y Neurocalcina. A) Superposición de las estructuras de Frq (amarillo/cian) y de Neurocalcina (marrón/verde) en su conformación unida a tres iones de calcio. Nótese la diferencia existente en la posición de la hélice J (cian/verde) entre ambas proteínas. **B)** Estructura molecular de Frq. La diferencia en el posicionamiento de la hélice J permite la accesibilidad al surco hidrofóbico de Frq (marcado en marrón). Bourne et al. 2001.

El primer dominio de unión a Ca^{2+} no es funcional, debido probablemente a que el Glu en posición $-z$ está mutado a Gly y por lo tanto se pierden sitios de coordinación con el catión. Para el caso de la Frq de *Drosophila*, el segundo motivo de *manos-EF* tampoco parece ser funcional ya que mutaciones en este dominio no afectan a la movilidad electroforética de la proteína en presencia de Ca^{2+} (Pongs et al., 1993). Estos

datos concuerdan con otros previos que muestran que Frq/NCS1 es capaz de unir únicamente 2 cationes de Ca^{2+} in vitro, pero con muy alta afinidad y cooperatividad ($K_{1/2} = 1\mu\text{M}$, $N_{\text{Hill}}=1.95$) (Cox et al., 1994). Esto permitiría a Frq responder frente a cambios en la concentración de Ca^{2+} , como los que se producen durante la liberación de neurotransmisor (0,1-100 μM). Algunos autores sugieren incluso que parte de la Frq disponible en la célula esté unida a calcio en condiciones de reposo (Burgoyne et al., 2004). Por último, la obtención de la estructura cristalizada de Frq humana, ha identificado un motivo estructural característico de esta proteína que no se encuentra en otras proteínas de la familia. Este dominio consiste en un surco hidrofóbico en la parte C-terminal, que debido al cambio posicional de la hélice-J en Frq con respecto a Neurocalcina o Recoverina, queda accesible a posibles uniones con el sustrato (Bourne et al., 2001; Ikura and Ames, 2006) (**Fig. I-7**). Además, la sobreexpresión de este motivo en células del Cáliz de Held tiene un efecto dominante negativo lo que sugeriría que es capaz de unirse y bloquear por sí solo al sustrato de Frq (Tsujimoto et al., 2002).

5.3 Frq/NCS1 y la regulación de la liberación sináptica. En general, los datos disponibles indican que Frq es capaz de potenciar la transmisión sináptica en distintas situaciones contextuales que varían según el sistema modelo en donde se ha realizado el estudio. La mayoría de los resultados obtenidos se basan en el análisis del exceso de función. En *Drosophila*, este análisis dió los siguientes resultados:

1) La liberación de neurotransmisor en NMJ mutantes V7 o transgénicos que expresan el cDNA de Frq bajo el control del promotor de hsp-70 (T-hsp70-Frq) era normal cuando se estimulaba a frecuencias bajas ($\leq 1\text{Hz}$), mientras que a mayores frecuencias ($>2\text{Hz}$) se producía un incremento en la respuesta postsináptica (Pongs et al., 1993) (**Fig. I-8A**). Debido a esta dependencia de los fenotipos con respecto a la frecuencia de estimulación, se denominó al gen alterado en los mutantes V7 como *frecuenina*. Esta potenciación en la respuesta postsináptica correspondía con las LFRs (*large facilitated response*) observadas en otros estudios (Mallart et al., 1991; Pongs et al., 1993; Rivosecchi et al., 1994). Las LFRs se caracterizan por la facilitación de las respuestas postsinápticas en estadios tardíos de la estimulación, es decir; tras la llegada de un número variable de estímulos, se produce una respuesta repentina de mayor amplitud que las anteriores. Este tipo de respuesta se puede dar en individuos control, pero a frecuencias de estimulación de 10 Hz y tras 30-45 segundos de estimulación,

mientras que en V7 ocurre tras 12-15 estímulos a 5Hz o tras 30-40 estímulos a 2Hz (Fig. I-8B).

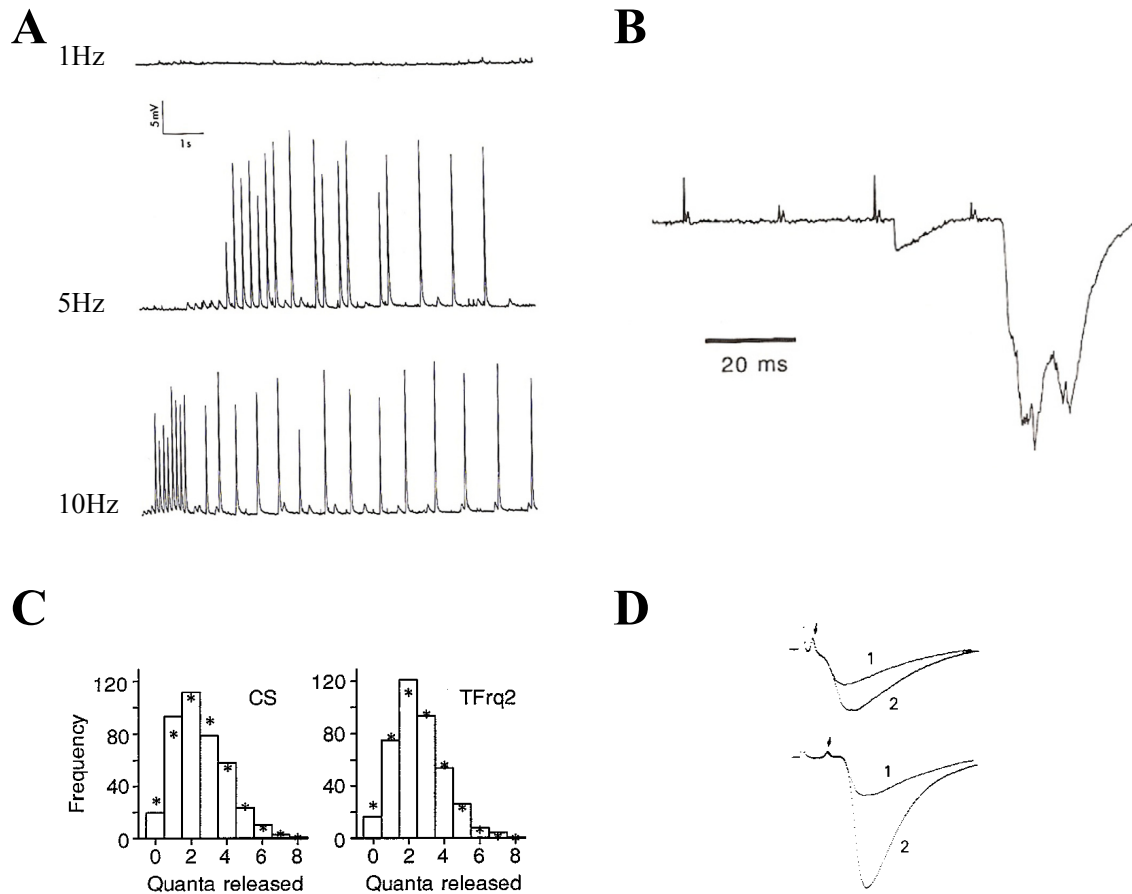


Figura I-8. Efectos de la sobreexpresión de Frq. **A)** Registros intracelulares (EJPs) en músculos de la pared larvaria de mutantes V7 durante trenes de estimulación a 1, 5 y 10Hz (0,1mM de Ca^{2+}). Los EJPs obtenidos en individuos control durante trenes de estimulación a 1, 5 y 10 Hz son similares a los mostrados para V7 a 1 Hz. Tomado de Pongs et al. (1993) **B)** Ejemplo de una respuesta LFR. Registros extracelulares (EJCs) mostrando las respuestas de mutantes V7 frente a trenes de cuatro estímulos. Observe la escasa o nula respuesta antes de la aparición de una respuesta LFR frente al cuarto estímulo. Tomado de Mallart et al. (1991). **C)** Análisis del *quantal content* en individuos control (CS) y T-hsp70-frq (TFrq2) a partir de los EJCs registrados en respuesta a estimulaciones de 1 Hz. Nótese la ausencia de cambios en la distribución de los valores del *quantal content* con respecto a la teórica esperada (representada por los asteriscos) en los controles y en los transgénicos que sobreexpresan Frq. Tomado de Rivoecchi et al. (1994). **D)** Efecto de Frq en la Facilitación sináptica por pares de pulsos. La imagen muestra las trazas de los EJCs obtenidos como respuesta al primer estímulo (1) y al segundo estímulo o test (2). Los pares de estímulos se dieron a intervalos de 20 ms y a 0,5 Hz. Observe el incremento de la amplitud en la segunda respuesta entre individuos que sobreexpresan Frq (panel inferior) e individuos control (panel superior). Tomado de Pongs et al. (1993).

2) El análisis de la cantidad de liberación (*quantal content*) en condiciones basales (no condicionadas) de mutantes V7, así como de T-hsp70-Frq no reveló

diferencias con respecto a los controles (**Fig. I-8C**). Sin embargo, sí se detectaron diferencias en el *quantal content* cuando se aplicaba un protocolo de doble estimulación a intervalos de 20 ms. Bajo este tipo de estimulación, los controles responden con un incremento en la segunda respuesta debido probablemente al calcio residual que queda en el interior del terminal presináptico tras el primer estímulo (**Fig. I-8D**). Este fenómeno se denomina Facilitación. En los individuos que sobreexpresan *frq* la facilitación se aumentaba 3 veces con respecto a los controles (**Fig. I-8D**). Aunque las bases moleculares de este fenotipo se desconocen, se ha sugerido que en *Drosophila* podrían deberse a un papel de Frq regulando el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Rivosecchi et al., 1994) o las corrientes de K^+ de tipo A (Poulain et al., 1994).

Posteriormente, la función de Frq/NCS1 ha sido analizada en otros sistemas modelo. A diferencia de los fenotipos descritos en *Drosophila*, se demostró que Frq es capaz de afectar la liberación basal en *Xenopus*. Su sobreexpresión producía un aumento de la frecuencia de liberación espontánea, así como en la amplitud de la respuesta evocada frente a estímulos a baja frecuencia (0,05Hz). Es interesante destacar que en estos experimentos se detectó una reducción en el retraso sináptico sugiriendo que en la NMJ de este organismo Frq actúa en la fusión vesicular (Olafsson et al., 1995). En células PC12, la sobreexpresión de Frq es capaz de potenciar la liberación vesicular evocada por los nucleótidos ATP o UTP, pero no la evocada por despolarización, mediante la activación de la Fosfatidil Inositol 4-Kinasa (PI4K- β) (Koizumi et al., 2002; Rajebhosale et al., 2003). Por último, en cultivos disociados de neuronas de hipocampo, Frq es capaz de regular la facilitación en respuesta a estimulaciones dobles (a intervalos de 20 ms), pero no afecta la liberación basal de neurotransmisor ni a las corrientes de Ca^{2+} , sugiriendo mecanismos independientes para el control de estos dos procesos (Sippy et al., 2003).

5.4 Frq/NCS1 y la regulación de canales iónicos. Además de las evidencias mostradas anteriormente en *Drosophila*, Frq/NCS1 parece controlar la actividad de canales iónicos. Así, se demostró que modula la facilitación de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q en la sinápsis del Cáliz de Held (Tsujimoto et al., 2002) y tipo N en la NMJ de *Xenopus* (Wang et al., 2001). También se ha demostrado que Frq/NCS1 regula los canales de K^+ de tipo A (Kv4) en oocitos de *Xenopus* (Nakamura et al., 2001). Todos estos datos señalan un papel de estas proteínas regulando la actividad de dichos canales,

sin embargo hasta ahora no se sabe si esta modulación se realiza mediante una interacción directa o indirecta con los canales.

5.5 Interacciones moleculares de Frq/NCS1. En los últimos años se han identificado cinco interacciones moleculares con Frq/NCS1. La dependencia del Ca^{2+} en estas interacciones así como los dominios necesarios para la interacción en los casos en los que se conoce se muestran en la **Fig. I-9**. De éstas, la más consistente en los diferentes sistemas de estudio ha sido la interacción con la Fosfatidil Inositol 4 Kinasa tipo III (PI4K β).

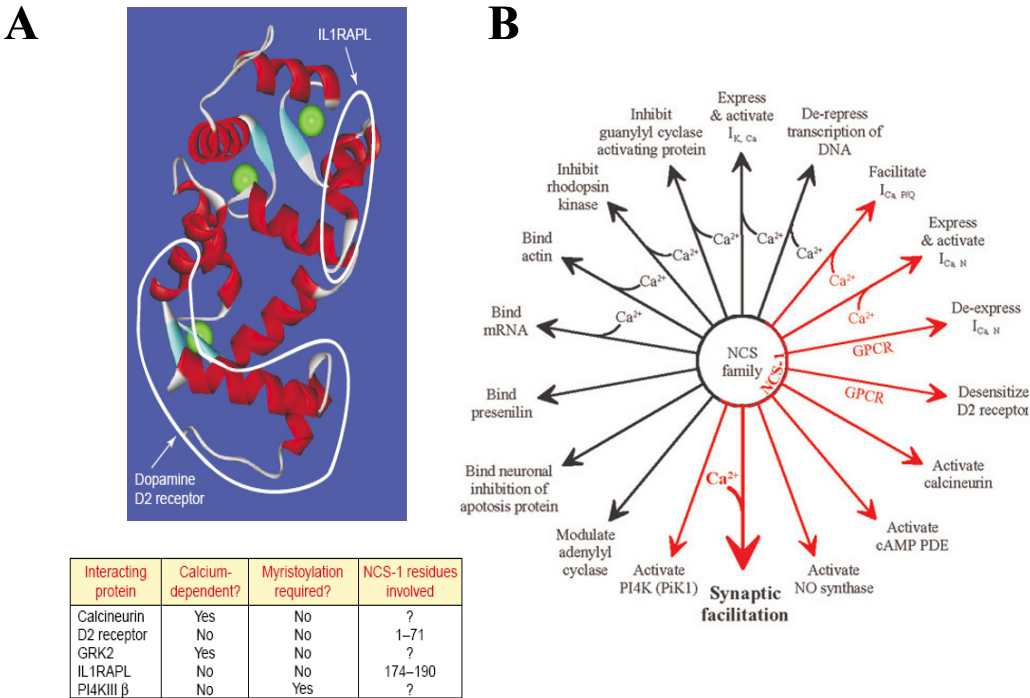


Figura I-9. Versatilidad funcional de Frq/NCS1. **A)** Interacciones moleculares descritas para Frq/NCS1. La imagen representa la estructura tridimensional de NCS1, señalando las zonas de la molécula responsables de la interacción con la diana. Además, en el recuadro se señalan la Ca^{2+} - así como la Miristoilo-dependencia de las interacciones descritas. Tomado de Bourgoyne 2004. **B)** Esquema de las funciones descritas para la familia NCS. En rojo se señalan las funciones descritas para Frq/NCS1, en negro las descritas para otros miembros de la familia NCS. GPCR indica los efectos mediados por la activación de la quinasa de receptores acoplados a proteínas G. Tomado de Zucker 2003.

Originalmente, esta interacción se detectó en *S. cerevesiae*, donde se demostró que la unión de Frq a PIK1 (una de las dos PI4K de tipo III existentes en levaduras) era independendiente de Ca^{2+} y producía un incremento de 3 a 10 veces en la actividad de

la PIK1 (Hendricks et al., 1999). Los mutantes termosensibles de Frq en levaduras (Frq^{ts}) son letales a temperaturas restrictivas y pueden ser rescatados por la expresión de PIK1, pero no al revés, indicando que PIK1 actúa *downstream* de Frq. PIK1 se localiza en el citoplasma y en el *trans*-Golgi de levaduras y sus mutantes presentan acúmulos de estructuras del Golgi así como defectos en el transporte vesicular (Audhya et al., 2000; Walch-Solimena and Novick, 1999). Estudios realizados en células de mamíferos han confirmado esta interacción a nivel bioquímico así como la colocalización, mediante técnicas inmuno-histoquímicas, de ambas proteínas (Rajebhosale et al., 2003; Taverna et al., 2002; Weisz et al., 2000). Estos estudios sugieren que la regulación de PI4K por parte de Frq produce el aumento de la exocitosis vesicular mediante un incremento del número de vesículas preparadas para liberarse (*docked vesicles*) o mediante el aumento de la competencia para fusionarse de vesículas individuales (*primed vesicles*) (Rajebhosale et al., 2003).

Estas funciones, junto con otras descritas en la bibliografía durante los últimos años, se encuentran esquematizadas en la **Fig. I-9B**, confirmando la elevada versatilidad funcional de las proteínas NCS y en general de la superfamilia de la Calmodulina. Sin embargo, a pesar del interés por Frq/NCS1, sólo existen hasta la fecha dos estudios en los que se analiza la falta de función de estas proteínas. Uno de ellos, muestra el requerimiento de Frq para la viabilidad en levaduras (Hendricks et al., 1999), y otro muestra el requerimiento de Frq en aprendizaje y memoria en *C.elegans* (Gomez et al., 2001). No existe ningún dato de los efectos de falta de función de Frq sobre la liberación sináptica, lo que justifica este trabajo.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Nuestro laboratorio está interesado en el estudio de genes que regulan la estructura y función sináptica. Desde su caracterización en *Drosophila*, se han identificado los homólogos de *frq* en todos los organismos donde se ha estudiado, desde levaduras a humanos. De igual forma, la relevancia funcional de este gen modulando la liberación de neurotransmisor ha sido ampliamente documentada. Los objetivos de esta tesis han sido los siguientes:

1. Analizar *in silico* las secuencias genómicas de *frq* en *Drosophila* y otras especies.
2. Esclarecer cual de los dos genes *frq* está afectado en los mutantes T(X;Y)V7 y es el responsable de los fenotipos previamente descritos.
3. Determinar el patrón de expresión de *frq1* y *frq2* durante el desarrollo.
4. Analizar los fenotipos morfológicos de las condiciones de exceso y falta de función de *frq1* y *frq2*.
5. Analizar la fisiología sináptica de las condiciones de exceso y falta de función de *frq1* y *frq2*.
6. Analizar los efectos comportamentales producidos por la alteración funcional de ambos genes.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTIRPES DE *DROSOPHILA*

Todas las estirpes de *Drosophila melanogaster* se mantuvieron según procedimientos estándar de laboratorio (Roberts, 1986). Las estirpes fueron obtenidas de la colección del laboratorio, excepto en los casos en los que se indica su procedencia.

Estirpe salvaje.

Canton-S (CS)

Generación de líneas transgénicas.

y w

y w ; CyO/Xa/MKRS

Ant¹⁰⁰/FM6, w

w ; Sp / CyO, GFP ; Ly / TM3, Sb

w ; Sco / CyO, GFP

Mutantes que afectan al gen *frq*.

T(X;Y)V7

w¹¹¹⁸, PBac{(w⁺), frq2[f06131]}. (Bloomington Dros. Stock Center, 18939)

Líneas Gal4.

w elav-Gal4^{C155} (Bloomington Dros. Stock Center, 458)

w ; D42-Gal4

y w; tub-Gal4^{LL7} / TM3, Sb

Mutantes e inserciones que afectan al gen *cac1*:

w; UAS-cac1-EGFP (R. Ordway)

w elav-Gal4 l(1) L13 HC129 sd, f / FM7i, GFP (R. Ordway)

w l(1) L13 HC129 sd, f / FM7i, GFP (R. Ordway)

w l(1) L13 20-3 sn / FM7i, GFP (R. Ordway)

Df(1) HF368 / FM7 c (Bloomington Dros. Stock Center, 965)

Mutantes que afectan al gen *Sh*.

ff Sh¹⁴ os / FM6

Mutantes que afectan al gen *fwd*.

w ; Df(3L)7C /TM6B (J. Brill)

w ; fwd^{3e} /TM6B (J. Brill)

Mutantes e inserciones de elementos P que afectan a genes implicados en la liberación de vesículas sinápticas.

Syx1A^{D229}, *ry /TM3*, *ry*, *Sb*, *Ser* (Bloomington Dros. Stock Center, 4379)
w; *P{ (ry⁺) PZ} Csp⁰³⁹⁸⁸*, *ry /TM3*, *Sb*, *Ser* (Bloom. Dros. Stock Cent., 11617)
y w ; *P{ (w⁺) LacW } Syb^{k07703} / CyO* (Bloomington Dros. Stock Center, 10678)
y w ; *syt^{AD4} / CyO*, *y⁺* (T. Schwartz)

2. GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GÉNICAS.

Las técnicas generales de biología molecular se realizaron según Sambrook (1989). La manipulación de DNA plasmídico se llevó a cabo en las cepas de *E. coli*; DH10B, SURE o XL1-Blue. La purificación de pequeñas cantidades de DNA plasmídico se realizó a través del kit de extracción JETquick (Genomed). La purificación de cantidades grandes de DNA plasmídico se realizó por lisis alcalina y purificación en columna a través del kit de extracción Qiagen Plasmid Maxi (Qiagen). Tras la obtención de todos los clonajes, se comprobó la veracidad de las secuencias clonadas mediante secuenciación y comparación con las bases de datos del NCBI o EMBL.

2.1 Vectores de clonaje.

pBluescript KSII+ (pBS): Vector derivado de pUC19 para clonaje de fragmentos de DNA. (Stratagene).

pBluescript (Not); pBS(Not): vector pBS al que se le ha modificado la región de policlonaje introduciendo las dianas NotI y XhoI y eliminando las dianas Dra-II y Apa-I. Amablemente cedido por los Drs Kent Golic y Yikang Rong.

pGEM-Teasy: Vector usado para el clonaje de fragmentos de DNA amplificados por PCR (Promega).

2.2 Vectores usados para la generación de líneas transgénicas.

pUAST: Vector derivado de un elemento P. Posee los extremos de un elemento P, el gen de selección *w⁺* y cinco repeticiones de las secuencias de levaduras UAS (*Upstream Activation Sequences*) que permiten la expresión, controlada por el factor de transcripción de levaduras Gal4, de las construcciones clonadas en posición 3' de dichas secuencias (Brand and Perrimon, 1993).

pUChs π Δ 2-3: Plásmido que aporta la expresión de la transposasa en la generación de moscas transgénicas por transposición de elementos P. Se coinyecta en embriones de *Drosophila* junto con las construcciones realizadas en vectores derivados de un elemento P.

2.3 Construcciones generadas para transfección en células Schneider2 (S2).

pCH2-myc-Frq1: La ORF de *frq1* se amplificó por PCR a partir de la construcción pUAST-*frq1* usando los oligonucleótidos o-518 y o-519. El producto amplificado se clonó en fase con 6 repeticiones del epitopo *myc* del vector pCH2myc usando las dianas BamH-I (compatible con Bgl-II en pCH2) y Xho-I, dando lugar a la construcción pCH2-6xmyc-*frq1*.

pCH2-myc-Frq2: La ORF de *frq2* se amplificó mediante PCR a partir de la construcción pUAST-*frq2* usando los oligonucleótidos o-520 y o-521 (**Tabla-1**). El producto amplificado se clonó en fase, usando las dianas Nco-I y Xho-I, detrás de 5 repeticiones del epitopo *myc* del vector pCH2myc. Esto dio lugar a la construcción pCH2-5xmyc-*frq2*.

Tabla-1. Oligonucleótidos utilizados para generar las construcciones pCH2.

o-518	CAAGGGATCCACATGGGAAAAAAGAGC	BamHI	myc-frq1
o-519	GAAGTACTCGAGCCCCCAAGATCTTTGT	Xho-I	myc-frq1
o-520	CCTTTACCATGGGCAAGAAGAAT	Nco-I	myc-frq2
o-521	TAGAACTCGAGGATCCCCCGCT	Xho-I	myc-frq2

2.4 Construcciones generadas para usar con el sistema UAS/GAL4.

pUAST-*frq1*: La región codificante (ORF) del mRNA de *frq1*, fue amplificada mediante RT-PCR a partir de RNA total de adultos de la estirpe CS usando los oligonucleótidos o-514 y o-515 (**Tabla-2**). El producto de amplificación se clonó usando las dianas de restricción Eco-RI y Sma-I en el vector pBS(Not). Posteriormente, este fragmento se transfirió al vector pUAST usando Not-I.

pUAS^t-*frq2*: La ORF de *frq2* se amplificó mediante RT-PCR a partir de RNA total de adultos de la estirpe CS usando los oligonucleotidos o-375 y o-376 (**Tabla-2**). El producto de amplificación se clonó en el vector pBS usando la diana Sma-I. Posteriormente se transfirió al vector pUAS^t usando las dianas Xho-I y Xba-I.

pUAS^t-RNAi: Para obtener esta construcción nos hemos basado en la estrategia de generación de un híbrido genómico-cDNA, que se ha demostrado ser eficiente para silenciar cualquier gen diana en *Drosophila melanogaster* (Kalidas and Smith, 2002). El DNA que contiene la ORF de *frq1* se amplificó por PCR, usando los mismos primers que para la construcción pUAS^t-*frq1*, y se clonó directamente en el vector pGEM-Teasy. De la misma forma y usando los primers o-400 y o-401 (**Tabla-2**), se amplificaron por PCR 2,3 Kb de DNA que contienen los exones 3, 4, 5, 6 y 7 con sus respectivos intrones así como el comienzo del exón 8 del gen *frq1*. Para esta PCR se usó como molde el clon genómico DS07826, que contiene la región cromosómica del locus del gen *frq1*. El amplicón obtenido se clonó en el vector pGEM-Teasy. Posteriormente y digiriendo la construcción pGEM-Teasy-*frq1* con las enzimas Bgl-II / Spe-I, se obtuvo un fragmento de DNA que contiene el ATG de inicio de la traducción más 450 p.b. de la secuencia codificante de *frq1*. Este fragmento se introdujo en orientación reversa a continuación del sitio Bgl-II presente en el 8° intron de la secuencia genómica de *frq1* previamente clonada en pGEM-Teasy, para dar lugar a la construcción pGEMTeasy-2,3Kb-genómico-*frq1*-450pb-reverse-cDNA, la cual se transfirió del vector pGEMTeasy a pUAS^t cortando con el enzima Not-I para dar lugar a la construcción pUAS^t-RNAi (**Fig. R9**).

pUAS^t-DN-Frq1: El fragmento Bgl-II/Xba-I de 261 p.b. obtenido tras digestión desde pUAS^t-*frq1*, se purificó y se clonó en pUAS^t con las mismas dianas. Este fragmento codifica para los 33 aminoácidos del extremo Cboxilo terminal de Frq1. Su secuencia es; MDKNHDGKLTLEEFREGSKADPRIVQALSLGGG.

pUAS^t-DN-Frq2: En el caso de pUAS^t-*frq2*, la digestión Bgl-II/Xba-I libera un fragmento de 133 p.b. Éste se clono directamente en pUAS^t cortado con las mismas dianas de restricción. Este fragmento contiene los 33 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de Frq2. Su secuencia es; MDKNHDDRLTLEEFREGSKADPRIVQALSLG GD.

Tabla-2. Oligonucleótidos utilizados para generar las construcciones pUAS_t.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Diana	Aplicación
o-514	ATCGAATTTCGAGCCACAACAAGAGAAC	-----	cDNAfrq1
o-515	GGAAGATCTTTGTTTAAGCGGGTTTCG	Bgl-II	cDNAfrq1
o-375	CTTGCAGATCGAACTGAGACC		cDNAfrq2
o-376	CGGCTAATCACCACTAACTT		cDNAfrq2
o-400	CACAGAGAAAGAAATACGTCAATGG		2,3Kb-RNAi
o-401	GAAGATCTCTGCTGTCCCTGTTT		2,3Kb-RNAi

3. TRANSFORMACIÓN EN LA LÍNEA GERMINAL

Las líneas transgénicas se generaron usando la técnica de transformación mediada por elementos P (Spradling and Rubin, 1982). Se microinyectaron embriones de 0-45 minutos de la estirpe *y w* con una solución que contiene 0,6 µg/µl de la construcción (en un vector que posee elementos P defectivos, así como el marcador *w*⁺) y 0,2 µg/µl del vector pUChsπΔ2-3 el cual aporta la actividad enzimática transposasa, necesaria para la movilización del elemento P (Mullins et al., 1989). Cuando los embriones llegan a la etapa adulta (G0), se cruzan con la estirpe *y w* y en la descendencia de este cruce (G1) se seleccionan las moscas transformantes por la presencia del marcador *w*⁺. Posteriormente se procede al mapeo del cromosoma en donde ha ocurrido la inserción y a la generación de líneas homocigóticas o balanceadas de forma estable.

4. RT-PCR CUANTITATIVA

La cuantificación relativa de los niveles de expresión de *frq1* y *frq2* se realizó mediante PCR a tiempo real. Esta técnica se ha convertido, entre otras aplicaciones, en el método más sensible para cuantificar moléculas de DNA (Bustin, 2000; Bustin, 2002).

4.1 Extracción de RNA.

Se extrajo RNA total de homogeneizados en TRIZOL (Invitrogen) de 20 individuos de cada genotipo según las instrucciones del fabricante. Todas las soluciones usadas para trabajar con RNA se trataron con 0,1% DEPC. La concentración se determinó midiendo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

4.2 Reacción de retrotranscripción (RT).

Se usaron 2 µg de RNA como molde para la reacción de retrotranscripción usando el kit *First Strand cDNA Synthesis* (Amersham Biosciences) en presencia de 0,2 µg de Oligo(dT) por reacción.

4.3 PCR a Tiempo Real.

Para la reacción de PCR se usaron oligonucleótidos específicos para cada gen analizado. Con el objetivo de eliminar posibles contaminaciones de DNA genómico, se diseñaron de tal forma que al menos uno de cada pareja solapara entre dos exones consecutivos (ver **Tabla-3**). Hemos analizado los niveles de expresión de los genes *frq1*, *frq2* y del gen de la subunidad de 140 KDa de la RNA polimerasa II (*RpIII40*) como normalizador interno (Falkenburg et al., 1987) en las distintas condiciones experimentales y controles. Los oligonucleótidos o-472 y o-473 amplifican un fragmento de 159 p.b. de *frq1*. Los oligonucleótidos o-474 y o-475 amplifican 138 p. b de *frq2* mientras que o-470 y o-471 amplifican 209 p. b. de *RpIII40*. Para comprobar la especificidad de los oligonucleótidos, los productos obtenidos se secuenciaron, verificando las secuencias obtenidas por BLAST en las bases de datos del NCBI y EMBL.

En cada reacción de PCR se usaron 4 µl de una dilución 1/50 de la RT original. Para la mezcla de reacción se usó el kit *SYBR Green* (Applied-Biosystems), según las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 25 µl. En todos los casos cada muestra fue analizada por triplicado. Como control negativo y antes de cada PCR, se comprobaba que no existía producto amplificado por PCR a tiempo final, usando como molde las mismas muestras de RNA pero sin hacer la RT. Además, para cada pareja de oligonucleótidos se llevaba un control en el que se usaba como molde dH₂O. La generación de la curva estándar para cada pareja de oligonucleótidos se realizó mediante reacciones de PCR de diluciones seriadas 1/5 (1/10, 1/ 50, 1/250 y 1/1250) de las RTs

realizadas con individuos de la estirpe silvestre CS. En todos los casos el diseño de oligonucleótidos así como las condiciones de PCR se optimizaron para que las eficiencias obtenidas fueran cercanas al 100% (valores de las pendientes de las curvas estándar entre -3,2 y -3,4). Todas las reacciones se han realizado en el termociclador modelo 7000 de Applied Biosystems usando las siguientes condiciones; 2min a 50°C, 10 min 95°C, 40 ciclos (15 seg. 95°C, 30 seg. 54°C, 30 seg. 68°C) y usando el protocolo de curvas de disociación. El sistema informático 7000 System Software nos proporciona los valores de regresión lineal sobre la curva estándar. Para calcular el índice relativo de expresión (Y) se usó la formula;

Y = (Xa/Ra) / (Xb/Rb) donde,

X= Media de los valores de regresión del gen problema (*frq1* o *frq2*).

R= Media de los valores de regresión del gen normalizador (RpII140)

a= valores obtenidos sobre las muestras experimentales.

b= valores obtenidos sobre las muestras control

Tabla-3. Oligonucleótidos usados para RT-PCR cuantitativa.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Localización
o-472	CGATCTACCAGATGGTGGGACAG	Exón 7-8 <i>frq1</i>
o-473	GAACTATACGTGGATCAGCTTTACTACCC	Exón 9 <i>frq1</i>
o-474	CGAATTCCTTTTCAGTGAAGTATGTG	Exón 2 <i>frq2</i>
o-475	CCGCCAAAGAGGAAAAGTAGACG	Exón 2-3 <i>frq2</i>
o-470	GCGTAACACGTATCAAAGCCCTATGGTAAGC	Exon 2-3 RpII140
o-471	GTTGTAGCCAGTGTAGCAGAGAATAGC	Exon 3 RpII140

5. HIBRIDACIÓN DE RNAs UNIDOS A MEMBRANA (NORTHERN-BLOT)

5.1 Construcciones de sondas para en ensayos de Northern-blot.

pGEMTeasy-sonda-*frq1*: Mediante RT-PCR de RNA total de adultos CS, se amplificó un fragmento de 304 p.b. correspondiente al exon 8 y parte de la región 3' UTR del transcrito de *frq1*. Para ello se usaron los oligonucleotidos o-382 y o-378 (**Tabla-3**), el fragmento amplificado, se clonó en el vector pGEMTeasy.

pGEMTeasy-sonda-*frq2*: De igual forma, se amplificó el fragmento de 244 p.b correspondientes a la región 5'UTR del mRNA de *frq2*, usando los oligonucleotidos o-321 y o-381 (**Tabla-4**). El producto amplificado se clonó en el vector pGEMTeasy.

Tabla-4. Oligonucleótidos usados para la fabricación de sondas.

Nombre	Secuencia 5'→3'	Localización	Aplicación
o-382	TACCAGATGGTGGGACAG	Exón 7-8 <i>frq1</i>	Sonda- <i>frq1</i>
o-378	TTTGTTTAAGCGGGTTTC	3' UTR <i>frq1</i>	Sonda- <i>frq1</i>
o-321	CGAACTGAGACCTATTTGG	5' UTR <i>frq2</i>	Sonda- <i>frq2</i>
o-381	TCCTTTTCAGTGAAGTATGTG	Exón 2-3 <i>frq2</i>	Sonda- <i>frq2</i>

5.2 Northern-blot. Se corrió un gel al 1,5% de agarosa-formaldehído con 25µg de RNA total de cada estadio de desarrollo analizado. Posteriormente los RNAs se transfirieron por capilaridad a una membrana de nylon (Amersham Biosciences). Para la generación de las sondas, entre 20-50 ng de los fragmentos sonda-*frq1* o sonda-*frq2* previamente clonados en pGEMTeasy, se liberaron por digestión con NotI y fueron marcados con [α -³²P]dCTP (50µCi por reacción) usando Ready-to-Go DNA labelling Beads (Amersham). Las sondas marcadas se purificaron usando columnas NICK NT Sephadex G50 (Amersham). Las membranas fueron incubadas toda la noche a 65°C en solución Z (7%SDS, 0,25M tampón fosfato pH 7,5) más la sonda marcada. Al día siguiente se hicieron 2 lavados de 15 min. en 2xSSC + 0,5% SDS y 2 lavados de 10

min. en 1xSSC + 0,5% SDS. Tras esto las membranas se incubaron a distintos tiempos de exposición, en una película X-OMAT - AR (Kodak) para su posterior revelado.

6. GENERACIÓN DEL ANTICUERPO CONTRA FRQ

Para la generación de anticuerpos contra Frq, se seleccionó el péptido QPQTEDENTPQKR de Frq2 (**Fig. R-1**) debido a su elevado índice de antigenicidad (Welling et al., 1985). La síntesis del péptido así como la inmunización de los conejos se llevaron a cabo por SIGMA. Las IgGs se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando columnas de sefarosa HiTrap NHS-activated HP (Amersham Biosciences), según las instrucciones del fabricante.

7. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA (WESTERN BLOT)

Los extractos de proteínas se realizaron a partir de 50-100 cabezas de adultos de 2-3 días de edad de cada genotipo analizado, mediante homogeneización en la solución; 50mM Tris-HCl pH 7,5, 50mM NaCl, 1% tritón X-100, Inhibidores de Proteasas (Genin et al.). Se midió la concentración de proteínas de los extractos mediante el método de Bradford. Tras añadir el tampón de carga (15mM Tris-HCl pH = 6,8, 75mM SDS, 10% Glicerol, 7% B-Mercaptoetanol, Azul de Bromofenol), las muestras se hirvieron 10 min y se cargaron las cantidades requeridas en geles de SDS-Poliacrilamida al 10-12% según el tamaño de la proteína a identificar y se sometieron a electroforesis. Para calcular el tamaño relativo de las proteínas se usó el marcador Kaleidoscope Prestained Standards (BIO-RAD). La transferencia a membrana de nitrocelulosa se realizó en un transferidor semiseco (LKB) a una intensidad de 3mA/cm² durante 45 min. en el tampón de transferencia (39 mM Glicina, 48 mM Tris-base, 0,0375 % SDS y 20% Metanol). Una vez transferida, la membrana se bloqueó en leche en polvo al 5% en TBST durante 1h. La incubación con el anticuerpo primario (anti-Frq 1/1000, anti-actina 1/1000) se realizó a 4°C durante toda la noche en TBST. Tras esto, se hacen 3 lavados de 10 min. en TBST y se incuba con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa durante 2h (1/1000). Posteriormente se vuelven a hacer tres lavados de 10

min en TBST y se revela con el sustrato quimioluminescente ECL según las instrucciones del fabricante (PIERCE).

8. HIBRIDACIONES DE RNA *IN SITU*

Los experimentos de hibridaciones *in situ* se realizaron sobre embriones *in toto* o sobre cortes al criostato de cabezas de adultos de la estirpe CS. Las ribosondas sentido y antisentido se sintetizaron mediante transcripción *in vitro* a partir de 1µg de las construcciones pGEMTeasy-sonda-frq1 y pGEMTeasy-sonda-frq2 debidamente linearizadas y usando las enzimas SP6 ó T7 RNA polimerasas. Para el marcaje de las sondas se usaron 2 µl por reacción de DIG RNA Labeling Mix siguiendo las instrucciones del fabricante. La pre-hibridación y posterior hibridación con la sonda (1/100) se hicieron en Solución de Hibridación (50% Formamida, 0,1% Tween-20, 50 µg/ml Heparina, 100 µg/ml ssDNA) a 58°C. Tras varios lavados de 20 min. con solución de hibridación a 55°C, los embriones se van pasando de forma escalonada a concentraciones crecientes de PBT (PBS + 0,1% Tween-20) en lavados de 10 min. La señal se detecta usando un anticuerpo anti-DIG conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer) (1:1000) y se revela usando la solución de tinción [100mM Tris-HCl pH=9,5, 100mM NaCl, 50mM Cl₂Mg, 35mg/ml NBT (Sigma), 14mg/ml BCIP (Boehringer)]. Una vez deshidratados, los embriones fueron montados en araldita y los cortes de cabeza en DePeX para su observación y fotografiado.

9. INMUNO-HISTOQUÍMICA

9.1 Inmunotinciones de células S2. Células *Schneider2* (S2) fueron crecidas hasta el 80% de confluencia y transfectadas con las construcciones pCH2-myc-Frq1 y pCH2-myc-Frq2 usando *Lipofectamine Transfection Reagent* según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). A las 48h después de la transfección, las células S2 se fijaron en Paraformaldehído 4% en PBS durante 15 min. Tras esto, se lavaron tres veces en PBS y se incubaron con el anticuerpo anti-Myc (SIGMA) diluido 1:1000 en PBS durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron 2-4h con el anticuerpo anti-mouse acoplado a Cy2 diluido 1: 1000 en PBS.

Posteriormente las células se montaron en el medio Vectashield (Vector Laboratories), para su posterior observación y fotografiado en el microscopio confocal.

9.2 Inmunotinciones de las NMJ larvarias. Las larvas de 3^{er} estadio de los distintos genotipos analizados, se disecaron en libro en PBT (0,2% Tween-20 en PBS) y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min. Una vez fijadas, las muestras se lavaron 3 veces en PBT durante 10 min. Tras esto se incubaron en solución de bloqueo (2% Albúmina de Suero Bovino, 5% Suero de Cabra en PBT) durante 1h. Posteriormente se incubaron en solución de bloqueo más el anticuerpo primario [nc82 1/10 (amablemente cedido por el Dr. Erich Buchner, de la Universidad de Würzburg y el Dr. Alois Hofbauer de la Universidad de Regensburg), anti-HRP 1/200 ó FITC-anti-HRP 1/100 (Jackson ImmunoResearch)] durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las muestras se lavaron 4-5 veces durante 10 min. en PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario [*goat anti-mouse* conjugado con Alexa-Fluor 488 ó Cy3 (1/500) ó *goat anti-rabbit* conjugados con Alexa-Fluor 568 ó Cy2 (1/500)]. Se lavaron 3 veces durante 10 min en PBT y se montaron en Vectashield (VECTOR) para la captura y análisis de imágenes en un microscopio confocal Leica TCS SP5 usando los objetivos de inmersión en aceite de 63X ó 100X.

9.3 Cuantificación del área de la unión neuromuscular. La superficie total ocupada por la NMJ de las fibras 6/7 del tercer segmento abdominal se calculó cuantificando la señal obtenida con el anticuerpo anti-HRP usando el programa ImageJ (v. 1,36). Se analizaron entre 8 y 12 larvas por genotipo tomando una NMJ por larva. Los datos se presentan como superficie promedio \pm s.e.m. La significación estadística de los resultados se analizó mediante el test T-Student. Las diferencias significativas entre los grupos analizados se señalan usando (*) si $P < 0,05$.

9.4 Cuantificación del número de sinápsis. Las sinápsis eran identificadas mediante el uso del anticuerpo nc82. Este anticuerpo reconoce a la proteína Bruchpilot (BRP) ortólogo en *Drosophila* de la proteína CAST (Kittel et al., 2006; Rasse et al., 2005; Wagh et al., 2006), el cual se ha usado en numerosos estudios como marcador específico de sinápsis. (Bao et al., 2005; Guo et al., 2005; Laissue et al., 1999; Qin et al., 2005; Wucherpennig et al., 2003). Se tomaron imágenes seriadas a una magnificación de 100X correspondientes a las NMJ completas de los músculos 6-7 de la pared larvaria del segmento abdominal 3. Cada una de las imágenes, espaciadas 1 μ m y a una resolución de 512 x 512 pixels, se analizó de forma individual usando el software ImageJ (Nacional Institute of Health). Se contaron el número de puntos nc82 positivos

usando material codificado. Los resultados se muestran como la Media \pm Error Standard del número de sinapsis contadas en toda la NMJ. La significación estadística de los resultados se analizó mediante el test T-Student. Las diferencias significativas entre los grupos analizados se señalan usando (*) si $P < 0,05$.

10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La preparación del tejido para microscopía electrónica, se hizo añadiendo algunas modificaciones al protocolo vigente en el laboratorio (Marin et al., 2004). La inmuno-histoquímica se realizó con el anticuerpo nc82. Larvas de tercer estadio se disecaron en solución Ringer [100 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 5mM HEPES y 115 mM Sacarosa] y se fijaron a 4°C durante toda la noche en solución de fijación [4% Paraformaldehído, 2,5% Glutaraldehído, 0,04% CaCl₂ en Tampón Fosfato 0,1M pH=7,2]. Tras esto, se incubaron en solución de bloqueo (2% Albúmina de Suero Bovino, 5% Suero de Cabra, 0,1% Tween 20 en tampón fosfato 0,1M) durante 1h a RT y se incubaron con el anticuerpo nc82 diluido 1/10 en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces durante 10 min en tampón fosfato y se incubaron durante 2 h con el anticuerpo anti-*mouse* biotinilado (1/500) (VECTOR Labs). Tras esto las muestras se lavaron tres veces en tampón fosfato y se revelaron usando Vectastain ABC Kit (VECTOR Labs) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se lavaron las muestras 3 veces durante 10 min en tampón fosfato 0,1M y se post-fijaron durante una hora en oscuridad con una solución al 1% de Tetróxido de Osmio (OsO₄) en tampón Fosfato 0,1M pH 7.2 con 0,02% CaCl₂ y 2,25% de sacarosa. Después se realizan tres lavados de 10 minutos cada uno en tampón Fosfato 0,1M pH 7,2. Tras esto se procedió a la deshidratación de las muestras incubándolas en concentraciones crecientes de etanol y se infiltraron en Epon 812. Los bloques se cortaron de forma seriada (70 nm de espesor) en el ultramicrotomo Reitchert Ultracut, se montaron en rejillas de Formvar y sin contrateñir con Acetato de Uranilo y Citrato de Plomo, se visualizaron en el microscopio electrónico JEOL 1200 EXII a 80 Kv.

12. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

El análisis de las secuencias se realizó usando las bases de datos EMBL/GENEBANK/DDBJ. Para la comparación de las secuencias se usó el programa BLAST del NCBI o EMBL. Los alineamientos múltiples de las secuencias aminoacídicas se realizaron usando el programa ClustalX (1.83). Los árboles filogenéticos se calcularon mediante el método *neighbour joining* y se visualizaron con el programa Treeview (v1.6.6). Los números de acceso en las bases de datos de las secuencias aminoacídicas de Frq/NCS1 o de las proteínas de la familia NCS de las distintas especies analizadas son: *Drosophila melanogaster* P37236 and NP_996502 para Frq1 y Frq2. *Danio rerio* NCS1a; AAH55168. *Danio rerio* NCS1b; AAU04982. *Rattus norvegicus* NCS1; NP_077342. *Mus musculus* NCS1; Q8BNY6. *Sacharomyces cerevesiae* NCS1; Q06389. *Homo sapiens* NCS1; AAH04856. *Xenopus laevis* FRQ; AAC59690. *Homo sapiens* VILIP1; P62760. *Mus musculus* VILIP1; P62761. *Homo sapiens* Hippocalcin; P84074. *Mus musculus* Hippocalcin; P84075. *Homo sapiens* Neurocalcin-D; P61601. *Mus musculus* Neurocalcin-D; Q91X97. *Homo sapiens* Recoverin; P35243. *Mus musculus* Recoverin; P34057. *Homo sapiens* KChIP3; NP_038462. *Homo sapiens* KChIP2; Q9NS61. *Mus musculus* KChIP2; Q9JJ69. *Homo sapiens* GCAP1; P43080. *Homo sapiens* GCAP2; Q9UMX6. *Homo sapiens* GCAP3; O95843.

11. ELECTROFISIOLOGÍA

Tanto los registros intracelulares (*whole-cell recordings*) como los extracelulares (*focal recordings*) fueron hechos, siguiendo el protocolo descrito por Cheung y colaboradores (Cheung et al., 1999), en el músculo longitudinal ventral seis del tercer segmento abdominal de preparaciones abiertas en libro de larvas de tercer estadio. Para los experimentos, las larvas se mantuvieron en solución fisiológica, *haemolymph-like*, HL3 ó HL6 (Macleod et al., 2002). Para la adquisición de los registros se usó el sistema de adquisición de datos de MacLab/4S (AD Instruments, Sydney, Australia).

11.1 Registros intracelulares de célula completa.

Este tipo de registros permite medir el potencial de membrana en la fibra muscular (célula post-sináptica en nuestro sistema) y por lo tanto analizar las diferencias de potencial que se generan como respuesta a eventos evocados; EJP (Excitatory Junctional Potentials) o espontáneos; mEJP (mini Excitatory Junctional Potentials) de liberación de neurotransmisor por la célula presináptica. Las larvas se disecan en libro usando medio de células *Schneider* (SIGMA), tras la disección se cambia el medio de células por el fisiológico; HL3 o HL6 al que se le ha añadido 1 mM de CaCl_2 . Los electrodos de registro (resistencia 40-60 $\text{M}\Omega$) se fabricaron a partir de capilares de vidrio usando el tirador modelo P-87 (SUTTER INSTRUMENTS, CO), se llenaron por capilaridad de KCl 3M y se microinyectaron en la fibra muscular a registrar. La estimulación de los nervios previamente seccionados, se realizó a una frecuencia de 1-2 Hz mediante un electrodo de succión de 10 μm de diámetro. Este tipo de registros por lo tanto, nos informan de la respuesta global de toda la célula muscular ante eventos espontáneos o evocados de liberación de neurotransmisor por parte de la célula pre-sináptica. Se registró la respuesta de un músculo longitudinal ventral 6 por larva. *n* representa el número de registros realizados en cada genotipo.

11.2 Registros focales extracelulares.

Este tipo de registros permiten medir las corrientes sinápticas provocadas por la liberación de neurotransmisor por una sola varicosidad del terminal nervioso. Para este tipo de registros se fabrican electrodos a partir de capilares de vidrio de 1,10 mm (Kimax) cuyos extremos se abren, usando un filamento incandescente, con un diámetro de 5 μm ó 2-3 μm según se usen para registrar botones de tipo Ib ó Is respectivamente. El extremo abierto del electrodo se talla con una inclinación de 45° para favorecer la aproximación a la muestra. La resistencia de sellado generada al aproximar el electrodo al botón que se va a registrar es de aproximadamente 1 $\text{M}\Omega$. La preparación de las larvas se hace de la misma forma que para los registros intracelulares. Posteriormente se identifican botones individuales, de tipo Ib o Is, localizados al final las ramificaciones de las motoneuronas MN6/7-1b ó MNSNb/d-1s respectivamente (Hoang and Chiba, 2001) mediante óptica Nomarski, usando un objetivo de inmersión en agua 40X. Al igual que para los registros intracelulares, la

estimulación se realiza mediante un electrodo de succión a una frecuencia de 1-2 Hz. Este tipo de registros permite medir las variaciones del voltaje que se produce en respuesta al flujo de corriente que sufre la célula post-sináptica en la región del botón en donde se ha situado el electrodo. Estas variaciones en la corriente pueden producirse de forma espontánea; mEJC (*miniature Excitatory Junctional Current*) o surgir como respuesta a un estímulo; corrientes evocadas ó EJC (*Excitatory Junctional Current*).

El *quantal content* de botones individuales se calculó dividiendo la media de los valores obtenidos en respuesta a un estímulo (EJC) entre la media de los valores espontáneos, en ausencia de estimulación, (mEJC). Se registró un botón por larva, *n* representa el número de registros.

11.3 Carga de los péptidos DN en motoneuronas.

Los péptidos Frql^{DN} (DKNHDGKLTLEEFREGSKADPRIVQALSLGGG), NCS1^{DN} (DKNADGKLTLEEFQEGSKADPSIVQALSLYDGLV) así como el péptido C-terminal barajado (DIDGDGQVNYEEFVQDTLASLSKLAKGLKALPQS) se sintetizaron y purificaron mediante HPLC en *Advanced Protein Technology Center* (Toronto ON, Canada). El fluoróforo Alexa-Fluor-594-C₅ se conjugó al extremo N-terminal del péptido Frql^{DN}. Los axones cortados de motoneuronas se llenaron con estos péptidos tal y como se describe en (Macleod et al., 2002). El nervio segmental seccionado se succionó con un electrodo de vidrio con un diámetro interno de 12 µm. Para confirmar el llenado de la motoneurona mediante microscopía confocal, se usó el colorante Texas Red (TR) junto con todos los péptidos, excepto cuando se usaba el péptido Frql^{DN} fusionado con el fluoróforo. Tras 40 min, la solución con el péptido se cambia por HL-6 realizándose registros extracelulares en botones de tipo Ib.

13. ENSAYOS DE COMPORTAMIENTO.

13.1 Aprendizaje asociativo en larvas.

Los experimentos de aprendizaje asociativo se realizaron adaptando los protocolos descritos por Bertram Gerber y Martin Heisenberg (Hendel et al., 2005;

Scherer et al., 2003). Se utilizaron larvas de 3^{er} estadio, desarrolladas y mantenidas a 25°C. Se usaron placas de Petri de 90 mm de diámetro (Stardsted) rellenas con agarosa al 1% disuelta en agua. Como refuerzo gustativo positivo se añadió Fructosa 2M (FRU, 99% pureza, SIGMA) a la solución de agarosa antes de que solidificara. Justo antes del experimento se cambiaron las tapas de las placas, por tapas previamente agujereadas en el centro (15 agujeros de 1mm de diámetro) para mejorar la aireación. Las larvas fueron recogidas del tubo y lavadas brevemente en agua antes de empezar el experimento. Los experimentos se realizaron en la campana extractora y en ausencia de luz. Como estímulos olfativos hemos usado el Amilacetato (AM; pureza 99%, SIGMA) diluido 1:50 en aceite de parafina (SIGMA) y el 1-octanol (OCT; pureza 99,5%, SIGMA) sin diluir. Estos olores fueron presentados añadiendo 10 µl en contenedores de teflón de 5 mm de diámetro que se situaron encima de la placa de agarosa y en posiciones opuestas de la placa, a 7 mm del borde (**Fig. R21A**). Se trabajó en grupos de 4 larvas a las cuales se sometía de forma individual pero simultánea a una fase de *entrenamiento* y posteriormente al *experimento*.

Fase de entrenamiento: En cada experimento se llevaron simultáneamente 2 condiciones de entrenamiento; en un caso el AM se presenta en placas que poseen el refuerzo gustativo FRU y el OCT en placas que no poseen refuerzo gustativo (AM+/OCT). Y en el otro el AM se presenta sin refuerzo mientras que el OCT se asocia a placas de FRU (AM/OCT+). Las larvas se sitúan en el centro de una placa (con o sin FRU, según la situación) que posee 2 contenedores del olor (AM ó OCT) y se deja libre durante 1 min. Para la mitad de los animales se comienza con AM y para la otra mitad con OCT. Para la mitad de los individuos, dentro de cada uno de estos subgrupos, empezamos con el refuerzo positivo FRU y para la otra mitad en ausencia de refuerzo gustativo. En cada entrenamiento se transfieren 4 larvas al centro de una placa que por ejemplo representa la situación; AM+ (contenedores con AM y placas de 1% agarosa + 2M FRU), se tapan y se dejan mover libremente durante 1 min, cuando acaba este tiempo se transfieren las 4 larvas a otra placa recién preparada con la situación contraria; OCT (contenedores con OCT y placas de 1% agarosa) y se dejan libres durante 1 min. Este ciclo de 2 situaciones distintas se repite 10 veces. Debido a que no existe tiempo de espera entre cada ciclo este tipo de entrenamiento se denomina entrenamiento *en masa*.

Fase experimental: Tras el entrenamiento, cada larva se transfiere a una placa fresca de agarosa al 1% en la que se han colocado AM y OCT en cada extremo, se tapa

y se deja mover libremente durante cinco minutos. La posición de cada larva se anota cada 20 segundos como amilacetato (a) si se sitúa dentro de la zona delimitada por un radio de 25 mm desde el contenedor del AM, octanol (o) si se sitúa dentro del mismo radio con respecto al contenedor que contiene OCT o neutra (n), si se sitúa fuera de las dos zonas anteriores. Aquellas que se metan en los contenedores de olor o que trepen por la tapa son descartadas.

Para cada individuo se calcula el valor de preferencia al AM ($PREF_{AM}$) como el número de veces que cada larva se cuenta en el lado del AM menos el número de veces que el animal se cuenta en el lado del OCT dividido entre el número total de conteos (incluyendo los de la zona neutral); $PREF_{AM} = (C_a - C_o) / (C_a + C_o + C_n)$. De esta forma valores positivos indican una preferencia del individuo analizado hacia el AM, mientras que valores negativos indican una preferencia hacia el OCT. Se calcularon las medias de los valores $PREF_{AM}$ de cada genotipo analizado. El grado de aprendizaje (LI) lo calculamos mediante la formula; $PREF_{AM}(AM/+, OCT) - PREF_{AM}(OCT/+, AM) / 2$, de tal forma que los valores mayores que 0 indican un aprendizaje asociativo (**Fig. R21**). N indica el número de larvas analizadas de cada genotipo en cada tipo de condicionamiento (AM+/OCT o OCT+/AM). Los resultados se representaron como cajas (*box plots*), y se han comparado estadísticamente usando los test de Dunnett o *t-Student* con un nivel de significación $P < 0,05$.

13.2 Comportamiento locomotor en adultos: Arena de Buridan.

Esta prueba se basa en la respuesta optomotora que presentan las moscas adultas cuando se les somete a un entorno uniformemente iluminado que posee dos marcas verticales inaccesibles (Gotz, 1980). Bajo estas condiciones las moscas de estirpes controles tienden a caminar desde una marca a la otra de forma espontánea y lineal, lo que permite la grabación del movimiento que realizan y su posterior análisis.

Para la realización de estos experimentos se usan individuos adultos de 3-5 días de edad. Antes de realizar el experimento, las moscas son anestesiadas con frío y se les corta las alas. Posteriormente se las introduce en jaulas individuales donde sólo tienen acceso a agua y se les deja recuperar a 25 °C durante tres horas. Transcurrido este tiempo las moscas se transfieren a la arena de Buridan, donde se graba su actividad locomotora durante 15 min usando una cámara QuickCam Zoom (Logitech) y el programa Trucker. Los datos se analizan individualmente mediante el programa Buridan Data Evaluation. La Arena de Buridan así como los programas mencionados

para la captura y análisis de la actividad locomotora han sido desarrollados y amablemente cedidos por el Dr. R. Wolf (Instituto Theodor-Boveri de Ciencias Naturales, Würzburg, Alemania).

RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *frq1* y *frq2*.

1.1 *frq* es un gen duplicado en *Drosophila*. El gen *frecuenina* (*frq*) se localiza en la zona 16F-17A del cromosoma X y corresponde a la unidad de transcripción CG5744 (Pongs et al., 1993). La comparación con el genoma de *Drosophila* de la secuencia anotada como L08064, correspondiente al mRNA de *frq* (Pongs et al., 1993), identificó, a unas 11 Kb en dirección proximal, una segunda unidad de transcripción no descrita hasta ahora. Esta nueva unidad de transcripción, está anotada como CG5907 y codifica una proteína con un alto grado de homología a Frq. Por este motivo hemos denominado a este gen *frecuenina2* (*frq2*), y al descrito previamente como *frecuenina1* (*frq1*). *frq2* se localiza en la banda 17A1-A2. Ambos genes presentan una estructura muy similar; 8 exones y 7 intrones, de los cuales el primer y el inicio del segundo exón no son codificantes, estas zonas de 365 y 345 p.b. constituyen las 5'-UTR de los genes *frq1* y *frq2* respectivamente (**Fig. R-1A**). Para el caso de *frq1* se ha descrito una zona 3'UTR de 4 Kb (Pongs et al., 1993), mientras que para el gen *frq2* sabemos, por el tamaño de su mRNA, que también contiene una zona 3'UTR de aproximadamente 3,2 Kb (**Fig. R-5B**). El punto de translocación T(X;Y)V7 (V7) queda situado entre los sitios de restricción Sst-I y BglII presentes en la zona 3' del gen *frq1* (Pongs et al., 1993). Al igual que para *frq1*, el gen *frq2* codifica una proteína de 187 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 22 KDa. El análisis del alineamiento de ambas secuencias aminoacídicas revela una identidad del 94,7% entre las dos proteínas. Frq2 se diferencia de Frq1 sólo en 10 aminoácidos (**Fig. R-1B**). De la comparación entre sus secuencias, cabe destacar que ambas proteínas conservan los cuatro dominios de unión a Ca^{2+} con el motivo “manos EF” y el sitio consenso de miristoilización MGXXXS/T(K) en el extremo N-terminal (Towler et al., 1988). Los cambios S→A en la posición 79 y K→R en la 163 afectan al residuo en posición -y implicado en la coordinación del catión del 2º y 4º motivo EF (Strynadka and James, 1989). Además, el cambio G→D en posición 162 se localiza dentro del cuarto dominio de unión a Ca^{2+} . Sin embargo para Frq1 se ha demostrado que el 2º motivo EF no es funcional (Pongs et al., 1993), con lo que únicamente los cambios en las posiciones 162 y 163 serían posibles candidatos a producir alguna diferencia en las propiedades cinéticas de unión a Ca^{2+} entre Frq1 y Frq2. El cambio en posición 5, S→N, no afecta al dominio de miristoilización ya que la secuencia consenso MGXXXS/T(K) se mantiene. La posición de los seis residuos restantes no parecen afectar a la cavidad hidrofóbica del extremo carboxilo terminal o

su accesibilidad (Fig. R-2), que en el ortólogo humano se considera importante para la unión de Frq a su sustrato (Bourne et al., 2001).

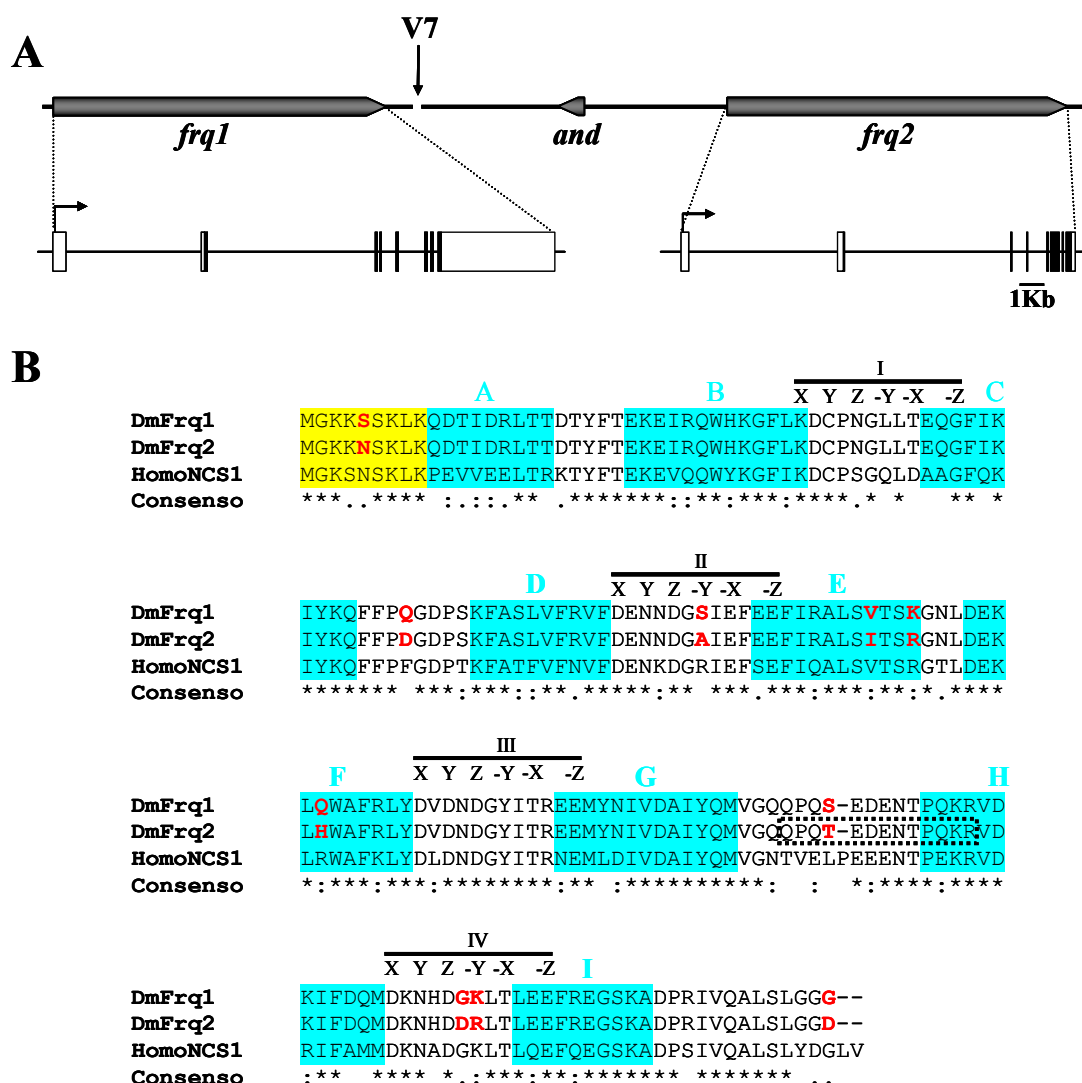


Figura R-1. A) Estructura de los genes *frq1* y *frq2*. Localización cromosómica de los genes *frecuenina1* (*frq1*), *andorra* (*and*) y *frecuenina2* (*frq2*). El centrómero está situado a la derecha del esquema. Los exones están representados como cajas negras (codificantes) o blancas (no codificantes). V7 representa el punto de ruptura generado por la translocación T(X;Y)V7. **B)** Secuencia peptídica de Frq1 y Frq2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de Frq1 y Frq2 de *Drosophila* y su ortólogo en humanos (NCS-1). Los cuatro dominios de unión a Ca²⁺ (I-IV) de tipo manos-EF se marcan con una barra negra así como las posiciones importantes en la coordinación del catión (x,y,z,-x,-y,-z) descritas en Strynadka y James (1989). Las secuencias sombreadas en azul indican los residuos que forman dominios de α -hélice (A-I) descritos en Bourne y colaboradores 2001. Los residuos sombreados en amarillo corresponden a la secuencia consenso de miristoilización. En rojo se marcan los 10 residuos de diferencia entre Frq1 y Frq2. La secuencia recuadrada por puntos indica el péptido usado para la generación de anticuerpos (descrito en materiales y métodos).

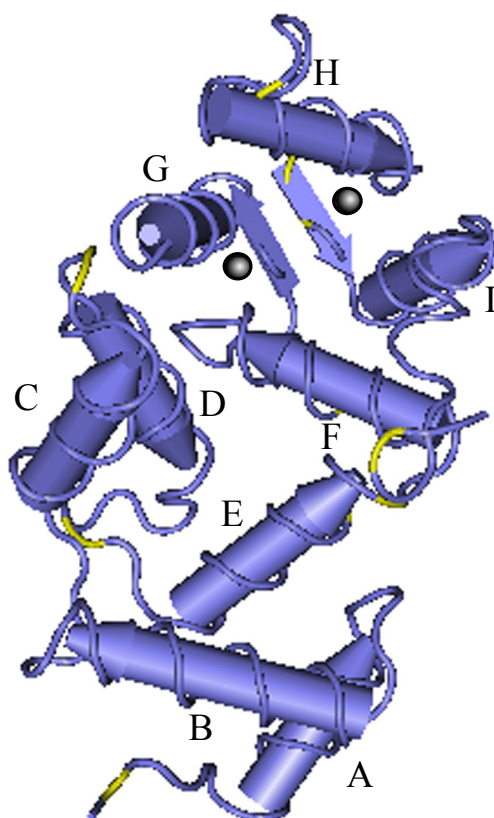


Figura R-2. Estructura tridimensional de Frq. Representación de la estructura terciaria de Frq a partir de la cristalización de su homólogo humano NCS1. En amarillo se indican las posiciones donde se sitúan los 10 residuos de diferencia entre Frq1 y Frq2. A-H representan las α -hélices. Los cationes Ca^{2+} se representan en forma de esferas negras. Realizado con el programa Cn3D v4.1 (Nacional Center for Biotechnology Information).

1.2 Conservación evolutiva de Frq1 y Frq2. El descubrimiento de dos parálogos para *frq* en *D. melanogaster* nos hizo buscar la repetición de este fenómeno en otras especies. Para ello, buscamos las secuencias aminoacídicas de los ortólogos de *frq/ncs1* mediante tBLASTx contra el genoma de la especie seleccionada. Los números de acceso de las secuencias encontradas se detallan en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. Hemos encontrado los co-ortólogos de *frq1* y *frq2* en todas las especies del género *Drosophila* en las cuales se ha realizado este análisis (*mojavensis*, *ananassae*, *yakuba*, *pseudobscura*, *simulans* y *virilis*). Los loci de ambos genes en el cromosoma X están conservados (**Fig. R-3A**). Además, las secuencias de Frq1 y Frq2 en estas especies están completamente conservadas. Sin embargo, no existen parálogos para *frq/ncs1* en otras especies de invertebrados como *Sacharomyces cerevesiae*, *Chaenorabditis elegans*, *Apis melifera* o *Anopheles gambiae*, ni de vertebrados como *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvergicus*, *Xenopus laevis*.

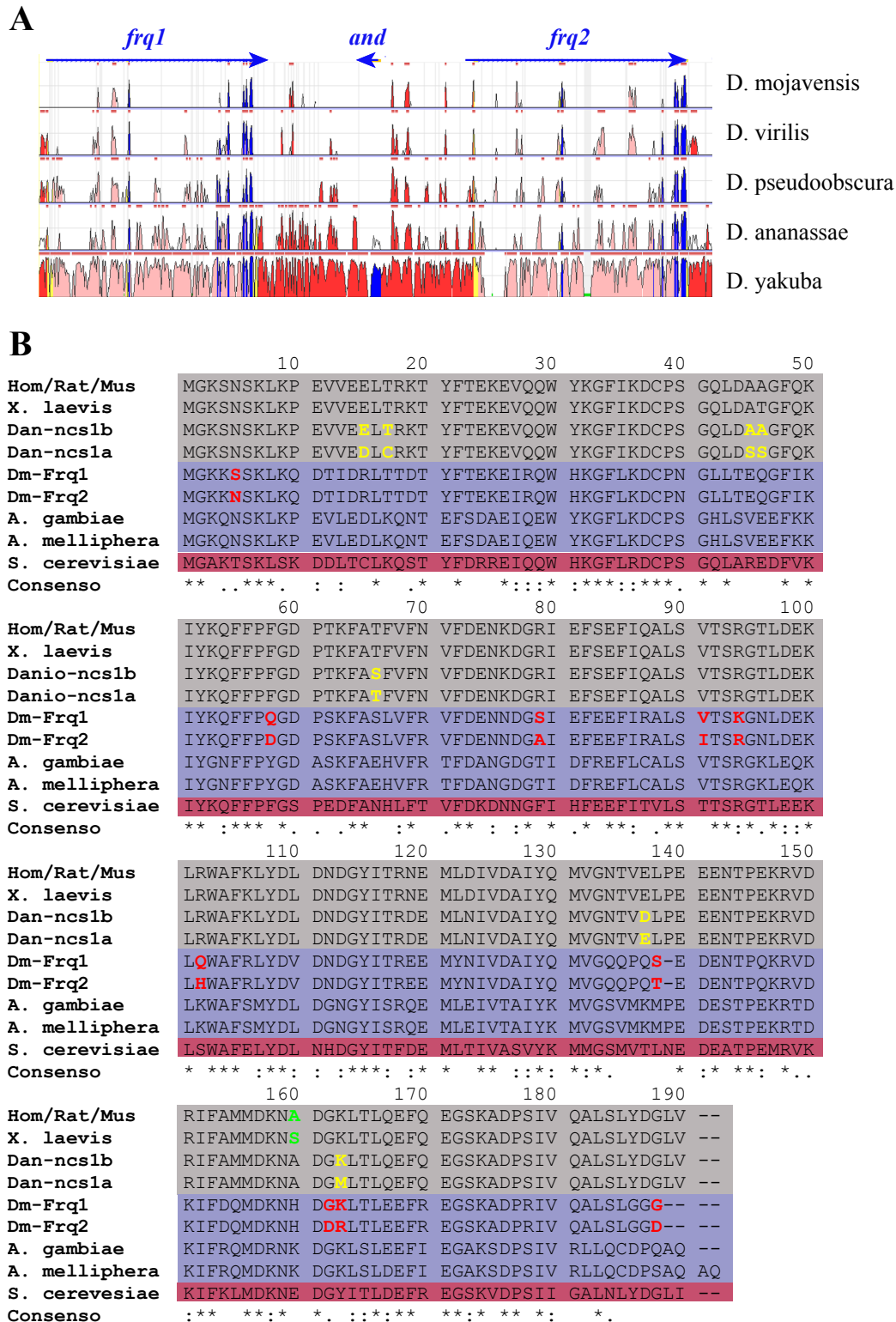


Figura R-3. A) Conservación génica de los dos parálogos de *frq* en el género *Drosophila*. Representación de las zonas de homología de secuencia entre los loci de los dos genes *frq* de distintas especies de *Drosophila*. Azul = exones codificantes, amarillo = UTR, rosa = intrones, rojo = elementos intergénicos. **B)** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los ortólogos Frq. El alineamiento se realizó con el programa ClustalX v.1.83. Existe únicamente un aa de diferencia (marcado en verde) entre las secuencias de NCS1 de humanos y de *Xenopus*. Los 7 residuos de diferencia entre los parálogos de *Danio rerio* y *Drosophila melanogaster* están marcados en amarillo y rojo respectivamente.

El único caso en el que se ha encontrado otra duplicación es en la especie *Danio rerio*, en donde el clonaje y caracterización de los genes *ncs1a* y *ncs1b* se ha descrito recientemente (Blasiolo et al., 2005). En la **Fig. R-3B** se muestra el alineamiento de las secuencias de los ortólogos de Frq en distintas especies. El alto grado de homología entre los ortólogos de vertebrados (casi el 100% de identidad entre *Xenopus*, *Rattus*, *Mus* y *Homo*) así como entre vertebrados e invertebrados (70%) indican la alta conservación de esta proteína a lo largo de la evolución. Además, el género *Drosophila* constituye el único caso en donde el mantenimiento de la duplicación se conserva entre especies tan separadas como *melanogaster* y *virilis/mojavensis* con tan alto nivel de restricción génica. Con el objetivo de saber si los dos parálogos de *Drosophila* pertenecen al mismo subgrupo dentro de la familia NCS, se realizó el alineamiento y su árbol filogenético, usando el programa ClustalX (1.83), de las dos secuencias de *Drosophila* contra los ortólogos de Frq en otras especies, así como con secuencias proteicas de miembros representativos de otros subgrupos de la familia NCS. Como se muestra en la **Fig. R-4**, tanto Frq1 como Frq2 de *D. melanogaster* forman parte de la Clase A, en donde se engloban el resto de ortólogos de Frq, mostrando una relación más lejana con otros miembros de la familia NCS.

2. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *frq1* y *frq2*.

2.1 Estudio del patrón temporal de la expresión de *frq1* y *frq2*. Los datos previos obtenidos en nuestro laboratorio mediante Northern-blot, demostraron que *frq1* expresa un transcrito de aproximadamente 6 Kb de forma mayoritaria en embriones tardíos, larvas de primer estadio pupas tardías y adultos (Pongs et al., 1993). El descubrimiento de *frq2*, nos planteó la necesidad de conocer con más detalle el patrón de expresión de ambos genes de forma diferencial durante los distintos estadios del desarrollo. Con este objetivo se realizaron experimentos de Northern-blot e hibridaciones *in situ* en los que se usaron sondas específicas que corresponden a regiones de baja homología de secuencia entre ambos mensajeros (ver Material y Métodos).

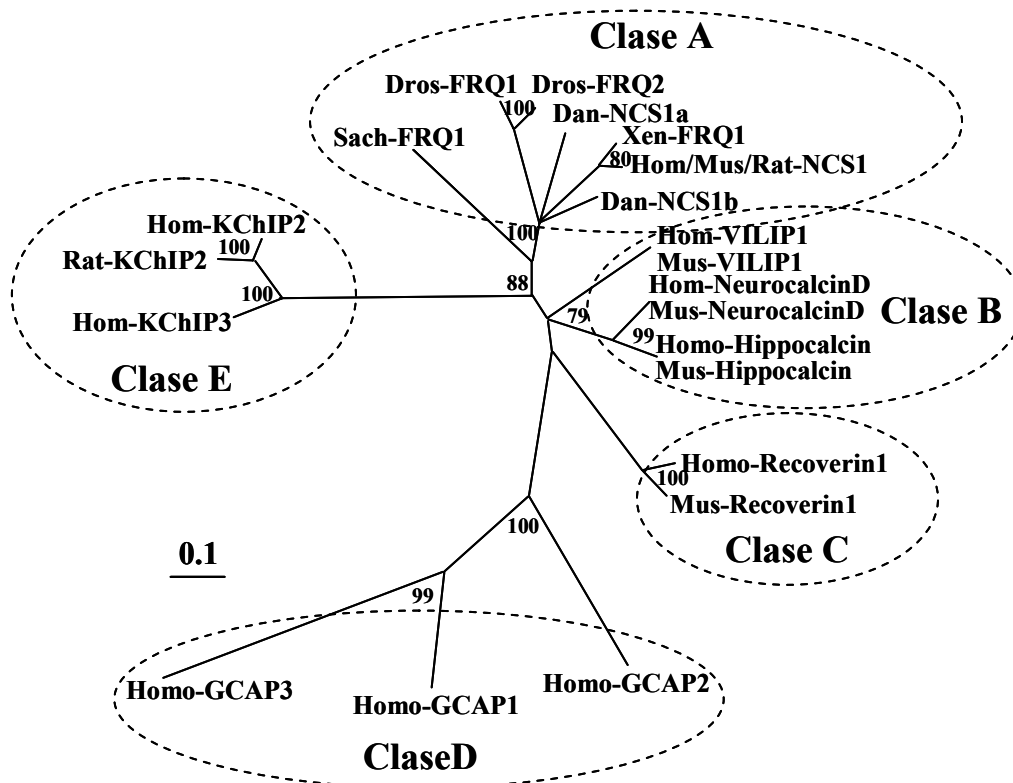


Figura R-4: Árbol filogenético de la familia NCS. Tras el alineamiento (usando el programa ClustalX v.1.83) de las secuencias aminoacídicas de Frq1 y Frq2 de *Drosophila*, sus ortólogos y distintas proteínas representativas de la familia NCS en otras especies, se obtuvo el árbol filogenético usando el método “neighbour-joining” (Saitou and Nei, 1987; Studier and Keppler, 1988). Su visualización se realizó usando el programa TreeView v1.66. Ambas Frqs aparecen englobadas dentro de la clase A en donde se encuentran el resto de ortólogos Frq/NCS1. Los números indican los porcentajes de “bootstrap”. La barra de calibración indica el número de sustituciones aminoacídicas por sitio.

Los experimentos de Northern-blot se realizaron con extractos de RNA total de embrión, larva 1, larva 2, larva 3, pupas y adultos de la estirpe control Canton-S (CS). Como se observa en la **Fig. R-5A**, y tal y como se describe en (Pongs et al., 1993), el mRNA para *frq1* es de un tamaño aproximado de 6 Kb y se detecta en estadios embrionarios, primer estadio larvario y adultos. Con esta técnica no se detecta expresión en los demás estadios analizados. Para el caso de *frq2* (**Fig. R-5B**), observamos expresión del mensajero únicamente en el primer estadio larvario y en adulto. El tamaño aproximado del mRNA de *frq2* es de 4,4 Kb, sin embargo la longitud del mensajero de *frq2* disponible en las bases de datos Flybase o Genebank es de 1,17Kb con lo que es probable que el mRNA de *frq2* posea una región 3’UTR extensa, de forma similar a lo que ocurre para el mRNA de *frq1* (Pongs et al., 1993). Estos resultados

demuestran la especificidad de las sondas usadas así como la similitud de los patrones de expresión de ambos genes a lo largo del desarrollo.

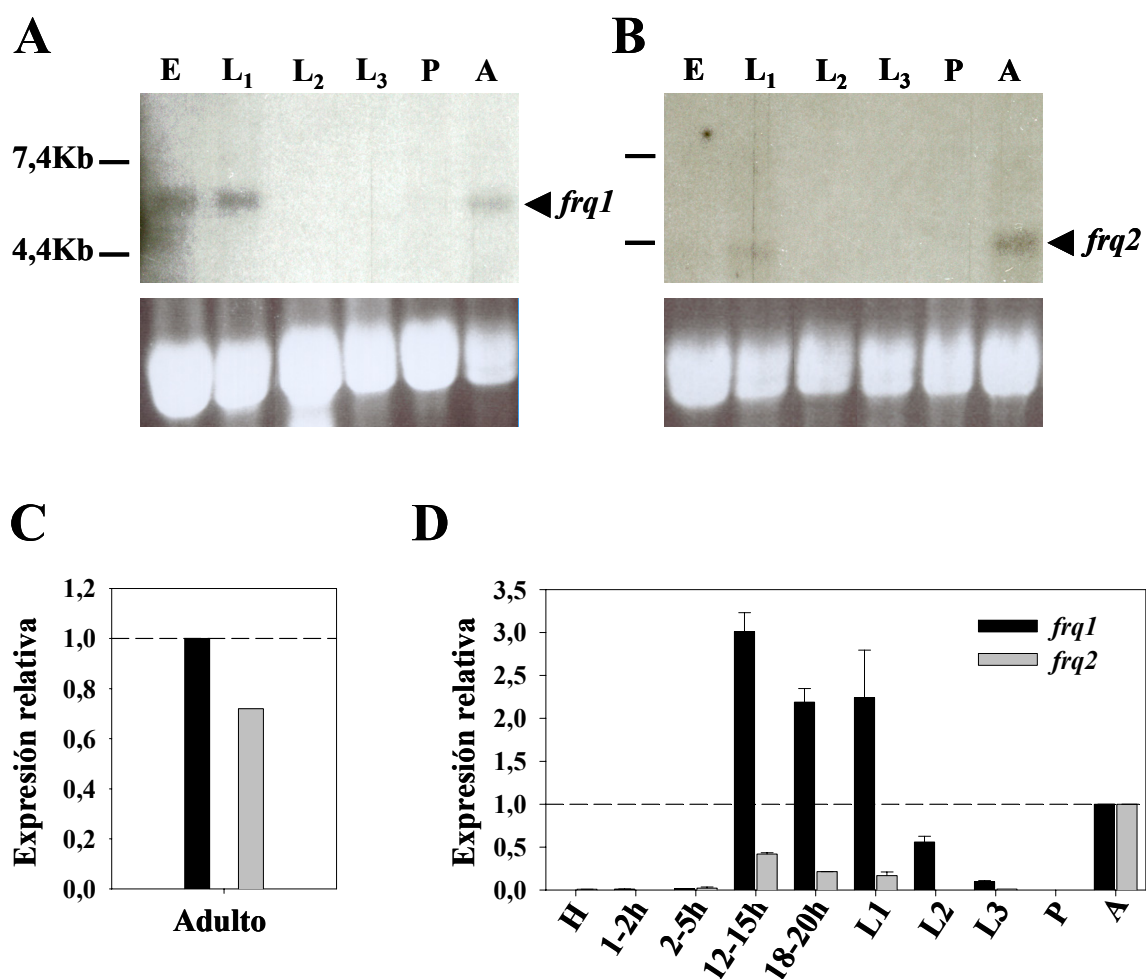


Figura R-5. Patrón de expresión de *frq1* y *frq2*. Northern-blot y QRT-PCR. Los extractos de RNA total de diferentes estadios embrionarios fueron separados electroforéticamente y transferidos a membranas, donde se hibridaron con sondas específicas para *frq1* (A) o *frq2* (B). En los paneles inferiores de las figuras A y B se muestran los RNA ribosómicos teñidos con bromuro de etidio como control de carga. C) Niveles relativos de expresión de ambas *frq* normalizados con respecto a los niveles de *frq1*. D) Niveles de expresión relativa de *frq1* durante distintos estadios del desarrollo, normalizados con respecto a los niveles de expresión de *frq1* en adulto (barras negras) o expresión relativa de *frq2* normalizada frente a los niveles de *frq2* en adulto (barras grises). H = huevos no fertilizados, embriones de 1-2h, 2-5h, 12-15h o 18-20h, L1= larvas de estadio I, L2= larvas de estadio II, L3 = larvas de estadio III, P = pupa, A = adulto.

No obstante, quisimos analizar de forma cuantitativa y comparada los niveles de expresión de cada gen, para lo que realizamos ensayos de QRT-PCR a partir de extractos de RNA de la estirpe CS de los distintos estadios de desarrollo. Para estos

ensayos se generaron oligonucleótidos, distintos a los usados para generar las sondas de Northern-blot, pero que amplifican regiones cortas (150-200 p.b) y específicas de los mensajeros a analizar (*frq1*, *frq2* y *RpIII40* como control endógeno). Éstos mejoran las eficiencias de reacción de PCR y permite una mejor reproducibilidad de los resultados. Antes de realizar los experimentos, comprobamos la especificidad de los productos amplificados mediante secuenciación (ver Materiales y Métodos). En la **Fig. R-5C** se muestran los niveles relativos de expresión entre ambos genes en el estadio adulto de individuos de la cepa control CS. Los resultados obtenidos indican que *frq2* presenta en este estadio unos niveles de expresión un 30% inferior a los de *frq1*. Cuando comparamos los niveles de expresión de *frq1* a lo largo del desarrollo frente a los niveles del adulto (**Fig. R-5D**), se observa que existe un pico de expresión, equivalente a 2-3 veces los niveles presentes en el adulto, en estadios embrionarios tardíos y primeros estadios larvarios. Para el caso de *frq2*, se observa un incremento de la expresión en los mismos estadios que *frq1*, aunque no alcanzan los niveles del adulto en ningún momento del desarrollo. Comparando los resultados obtenidos por Northern-blot y QRT-PCR (**Fig. R-5**), podemos concluir que ambos genes se expresan en los mismos estadios del desarrollo (principalmente al final de la embriogénesis, primeros estadios larvarios y en el adulto), aunque los niveles de expresión de *frq2* son siempre inferiores a los de *frq1*. Esto puede deberse a que los *enhancers* o zonas reguladoras de la transcripción de *frq1* sean más fuertes y se produzca más cantidad de transcrito de *frq1* que de *frq2*, ó a que la regulación espacial de ambos genes también sea específica, de tal manera que *frq1* se exprese en más tejidos, o más células de un determinado tejido, que *frq2*. Probablemente las diferencias observadas entre ambos genes se deban al control específico y diferencial, tanto a nivel cuantitativo como espacial, de la expresión de *frq1* y *frq2*.

2.2 Estudio del patrón espacial de expresión de *frq1* y *frq2*. Los datos previos obtenidos en nuestro laboratorio demostraron la localización del RNA y la proteína de *frq1* en el SNC de embriones de estadio 16-17, en la unión neuromuscular de larvas de tercer estadio y en el cerebro de adultos. De igual forma que en el apartado anterior, quisimos conocer la localización diferencial en la expresión de ambos genes. Para ello se realizaron ensayos de hibridación *in situ* en embriones y en secciones de cabezas adultas de la estirpe CS. Para estos experimentos se usaron las mismas sondas específicas de cada uno de los genes que las usadas en los experimentos de Northern-blot.

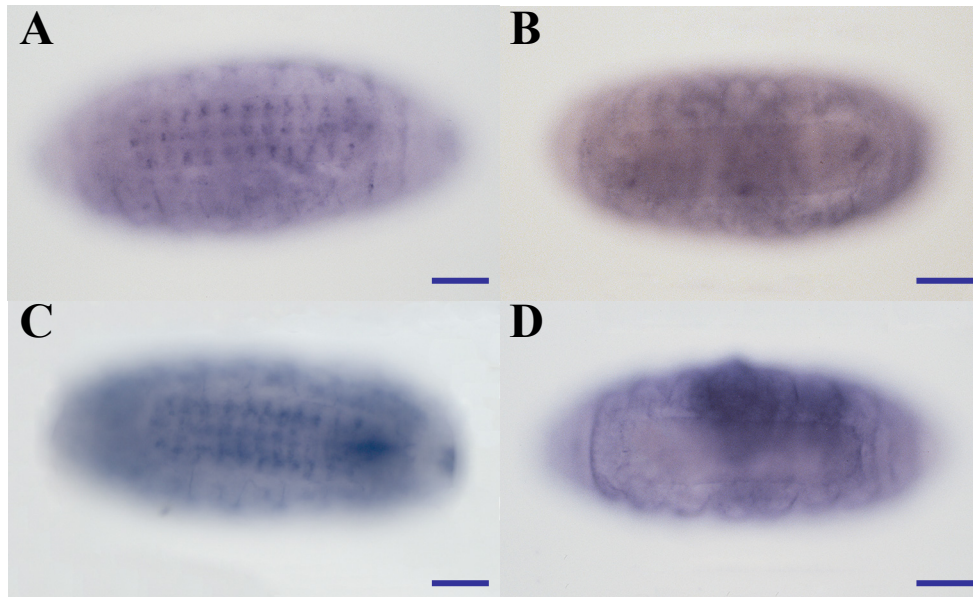


Figura R-6. Patrón de expresión de *frq1* y *frq2*; Hibridaciones *in situ* en embriones. Se utilizaron las siguientes ribosondas marcadas con digoxigenina sobre embriones CS de estadio 16-17: antisense-*frq1* (A), sentido-*frq1* (B), antisense-*frq2* (C), o sentido *frq2* (D). Barra=100µm.

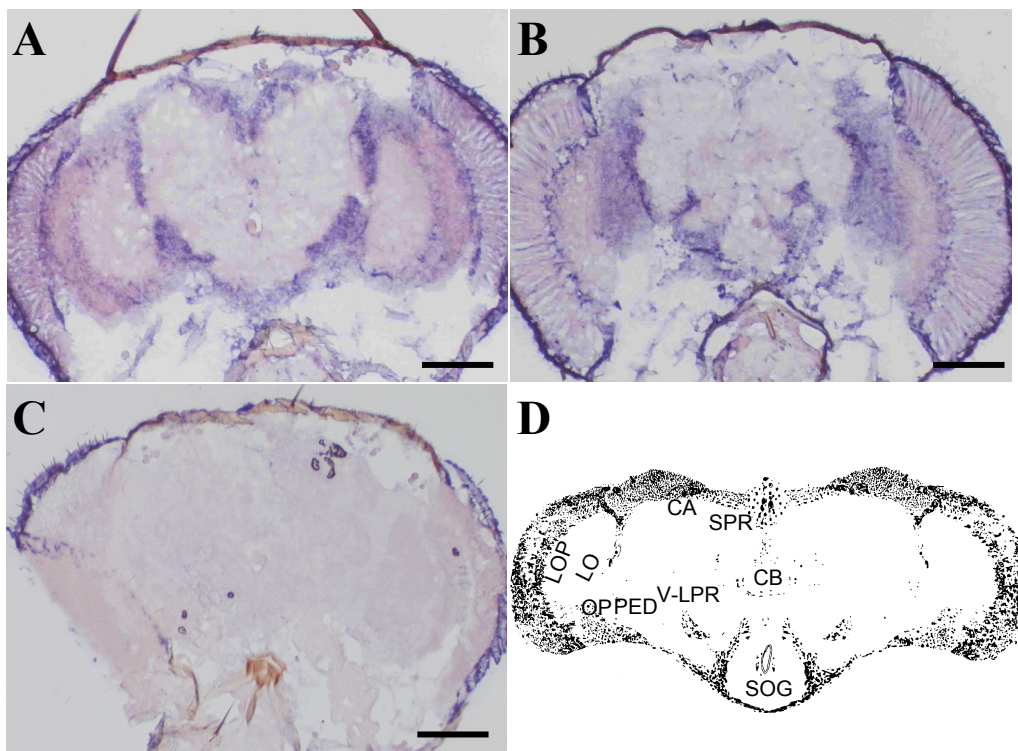


Figura R-7. Patrón de expresión de *frq1*; Hibridación *in situ* en adultos. Las secciones de cabezas de adultos de la estirpe normal CS, fueron hibridadas con las siguientes ribosondas específicas; antisense-*frq1* (A,B), sentido-*frq1* (C). En el panel D se muestra un mapa de la distribución espacial de los somas neuronales que forman el cerebro del adulto (modificado de Strausfeld NJ, 1976). CA; cáliz del cuerpo achampanado. CB; neuropilo del complejo central. SOG; ganglio sub-esofágico. SPR; Protocerebro superior. LOP; Placa de la Lóbula. LO; Lóbula. OP PED; Pedúnculo Óptico. V-LPR; Protocerebro Vento-lateral. Barra=125µm.

Los resultados obtenidos en embriones se muestran en la **Fig. R-6AC**, en donde se aprecia una expresión específica y restringida de ambos genes en el ganglio ventral del SNC de embriones de estadios tardíos (16-17) no obteniéndose señal en estadios anteriores.

Como controles negativos, las muestras se hibridaron con la sonda sentido de *frq1* o *frq2* (**Fig. R-6BD**). Para el análisis en el estadio adulto las sondas se hibridaron sobre cortes frontales de cabezas de adulto. Para el caso de *frq1* se detecta expresión de forma ubicua en los somas de la mayoría de las neuronas que forman el cerebro del adulto (comparar **Fig. R-7A y B con D**), en la **Fig. R-7C** se muestra el control negativo (sonda sentido-*frq1*). Estos resultados confirman la expresión ubicua detectada previamente para este gen mediante inmuno-histoquímica (Pongs et al., 1993). Sin embargo, mediante esta técnica no hemos obtenido un patrón de tinción específico cuando hibridamos con la sonda específica de *frq2* (datos no mostrados).

2.3 Localización subcelular de Frq1 y Frq2. Con objeto de conocer el patrón de localización de ambas proteínas a nivel subcelular, se realizaron transfecciones transitorias en células embrionarias de *Drosophila*, *Schneider2* (S2). Se transfectaron las construcciones de Frq1 y Frq2 fusionadas a seis o cinco repeticiones del epítipo *myc* respectivamente (CH2-6xmyc-Frq1 y CH2-5x myc-Frq2). A las 48h de la transfección, se realizó un *western-blot* y una inmunotinción de estas células con el anticuerpo anti-*myc*. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. R-8**. El tamaño observado por *western-blot* de las proteínas es el esperado según el número de repeticiones *myc* fusionadas. Como control negativo, se transfectó el cDNA de Frq1 sin fusionar a *myc* (**Fig. R-8A**). En cuanto a la distribución subcelular de ambas proteínas, no encontramos diferencias entre las dos, encontrándose distribuidas de forma homogénea por el citoplasma (**Fig. R-8B**). También para ambas proteínas se observa cierta acumulación de la señal en áreas perinucleares y de membrana plasmática.

3. GENERACIÓN DE MUTANTES DE EXCESO Y FALTA DE FUNCIÓN

El principal objetivo de este estudio es comprender el papel que realizan estos dos genes. Decidimos abordar esta pregunta mediante dos tipos de modificaciones

genéticas; a) generación de mutantes de falta de función y b) obtener mutantes de exceso de función.

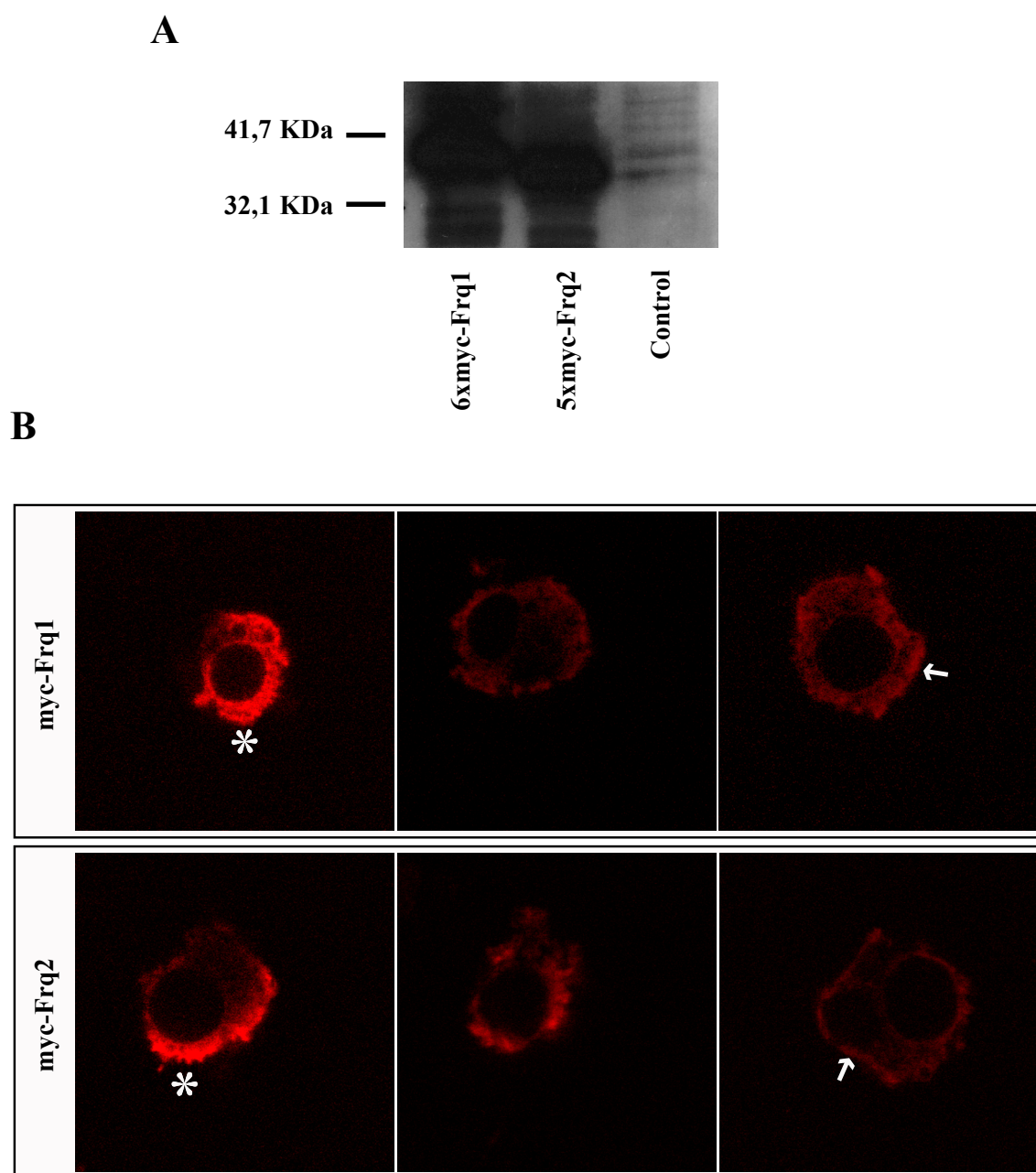


Figura R-8. Localización subcelular de Frq1 y Frq2. A) *Western-blot* de extractos de proteínas de células S2 transfectadas con las construcciones 6xmyc-Frq1, 5xmyc-Frq2 y Frq1 como control negativo. B) Imágenes de microscopía confocal de células transfectadas con las construcciones 6xmyc-Frq1 o 5xmyc-Frq2. Las inmuno tinciones se realizaron incubando con el anticuerpo anti-myc como anticuerpo primario y anti-mouse acoplado al fluoróforo Cy3 como anticuerpo secundario. (*) zona perinuclear. (→) zonas de membrana plasmática.

3.1 Generación de mutantes de exceso de función de los genes *frq1* y *frq2*. Se disponían de líneas transgénicas que sobre-expresan *frq1* bajo el control del promotor *hsp70*, de forma que se puede inducir la expresión de *frq1* en todos los tejidos aplicando a estas moscas un choque de calor. También disponíamos de los mutantes V7, que poseen una translocación cromosómica cuyo punto de ruptura afecta la expresión de *frq* (Pongs et al., 1993). Sin embargo, al descubriendo de *frq2* en un locus tan cercano al de *frq1*, nos planteó la necesidad de conocer si los mutantes V7 tenían alterado los niveles de ambos genes, o si este reordenamiento afectaba de forma específica a *frq1* o *frq2*. Además, la caracterización completa de ambos genes requería de la generación de herramientas que permitieran sobre-expresar de forma específica uno u otro gen. Para ello usamos el sistema UAS/Gal4 de levaduras (Brand and Perrimon, 1993). Se clonaron las secuencias codificantes de ambos genes en el vector pUAST, de tal forma que las ORF quedan bajo el control de las secuencias de levaduras UAS (*Upstream Activating Sequences*) (ver Materiales y Métodos). Posteriormente y siguiendo los procedimientos estándar de transformación mediada por elementos P, las construcciones se microinyectaron en embriones y *w*. Las líneas obtenidas se denominaron UAS-*frq1* ó UAS-*frq2* según contuvieran la ORF de uno u otro gen. Se determinó el cromosoma de inserción y se generaron líneas estables, cuyos genotipos se exponen en la **Tabla 5**. Para que el sistema UAS/Gal4 funcione, se necesita una activación en “trans” del factor transcripcional de levaduras Gal4, éste se une específicamente a la región UAS y provoca la expresión de la construcción. El Gal4 se aporta cruzando las líneas transgénicas UAS con diferentes líneas en las que el Gal4 se encuentra bajo la expresión de un determinado regulador. En *Drosophila* existe una colección muy amplia de líneas Gal4 insertadas bajo el control de distintos reguladores, lo que permite poder expresar las construcciones UAS en prácticamente cualquier momento del desarrollo o tejido deseados.

Tabla 5. Líneas transgénicas de sobreexpresión de Frq1 o Frq2.

Nombre	Genotipo	Cromosoma inserción
UAS-Frq1 ^{49B}	yw, P[(w+)UAS-Frq1 ^{49B}]	1
UAS-Frq1 ^{58A}	yw, P[(w+)UAS-Frq1 ^{58A}]	1
UAS-Frq1 ^{64C}	yw ; P[(w+)UAS-Frq1 ^{64C}]/CyO	2
UAS-Frq1 ^{62A}	yw ; P[(w+)UAS-Frq1 ^{62A}]/CyO	2
UAS-Frq1 ^{46C}	yw ; P[(w+)UAS-Frq1 ^{46C}]	3
UAS-Frq1 ^{24B}	yw ; P[(w+)UAS-Frq1 ^{24B}]	3
UAS-Frq2 ^{14A}	yw, P[(w+)UAS-Frq2 ^{14A}]	1
UAS-Frq2 ^{8A}	yw; P[(w+)UAS-Frq2 ^{8A}]	2
UAS-Frq2 ^{33C}	yw; P[(w+)UAS-Frq2 ^{33C}]/ CyO	2
UAS-Frq2 ^{42A}	yw; P[(w+)UAS-Frq2 ^{42A}]/ CyO	2
UAS-Frq2 ^{43A}	yw; P[(w+)UAS-Frq2 ^{43A}]	3

3.2 Generación de mutantes de falta de función de *frq1* y *frq2*. Una de las formas más efectivas de estudiar la función de un gen es el análisis fenotípico de su falta de función. En *Drosophila*, esto se ha realizado tradicionalmente tratando poblaciones de moscas con agentes mutagénicos, e identificando posteriormente lesiones que afecten al gen diana. Sin embargo este procedimiento es laborioso y puede no afectar al gen de interés. Recientemente se ha descrito una técnica para generar mutantes por recombinación homóloga en *Drosophila* (Rong and Golic, 2001). En este trabajo hemos intentado generar mutantes de *frq2* usando esta técnica, pero no hemos obtenido ningún evento de recombinación en este locus. Debido a esto, junto con el hecho de que dicha técnica no ha reflejado su éxito en la literatura, decidimos abordar la generación de mutantes de falta de función mediante la técnica de interferencia de RNA de doble cadena. Desde su descubrimiento en *C. elegans* (Fire et al., 1998), la técnica de RNAi se ha usado con éxito para anular genes en varios sistemas como *A. thaliana*, *D. melanogaster* y *M. musculus* (Chuang and Meyerowitz, 2000; Kennerdell and Carthew, 1998; Wianny and Zernicka-Goetz, 2000). En los últimos años se ha descifrado gran parte del mecanismo funcional de RNAi. La presencia de un RNA de doble cadena provoca su procesamiento por el enzima *Dicer*, que lo corta en pequeños RNAs de 21-25 nucleótidos de longitud (siRNAs). Posteriormente, éstos son incorporados por el

complejo proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*) que reconoce y degrada mRNAs que contengan secuencias complementarias a los siRNAs (**Fig. R-9A** y (Hammond et al., 2001; Hutvagner and Zamore, 2002). Además, esta técnica, frente a las otras expuestas arriba, presenta la ventaja de poder controlar espacio-temporalmente la anulación del gen a estudiar mediante el uso simultáneo del sistema UAS/Gal4 (Brand and Perrimon, 1993).

Aquí, para anular la función de los genes *frq*, decidimos usar una variante de la técnica de RNAi descrita en Kalidas and Smith (2002). Para ello hicimos una construcción que contenía una región de ~2,5 Kb del DNA genómico de *frq1* en la que se encuentran los exones 3, 4, 5, 6, 7 y el inicio del exón 8 con sus correspondientes intrones, seguida por el cDNA de *frq1* hasta el inicio del exón 8 pero en orientación inversa (**Fig. R-9A**). Esta construcción se clonó en el vector pUAST (ver apartado correspondiente de Materiales y Métodos) y se microinyectó en embriones. Las líneas obtenidas se denominaron UAS-RNAi, se localizó el cromosoma en el que se habían insertado y se generaron líneas estables (**Tabla 6**). La expresión de esta construcción bajo el control del factor de transcripción Gal4, producirá la expresión de la parte genómica y el procesamiento de los intrones incluidos en el fragmento de 2,5 kb junto con el cDNA en orientación inversa, dando lugar a un RNAi de aproximadamente 350 p.b que disparará la degradación endógena del mRNA (**Fig. R-9**).

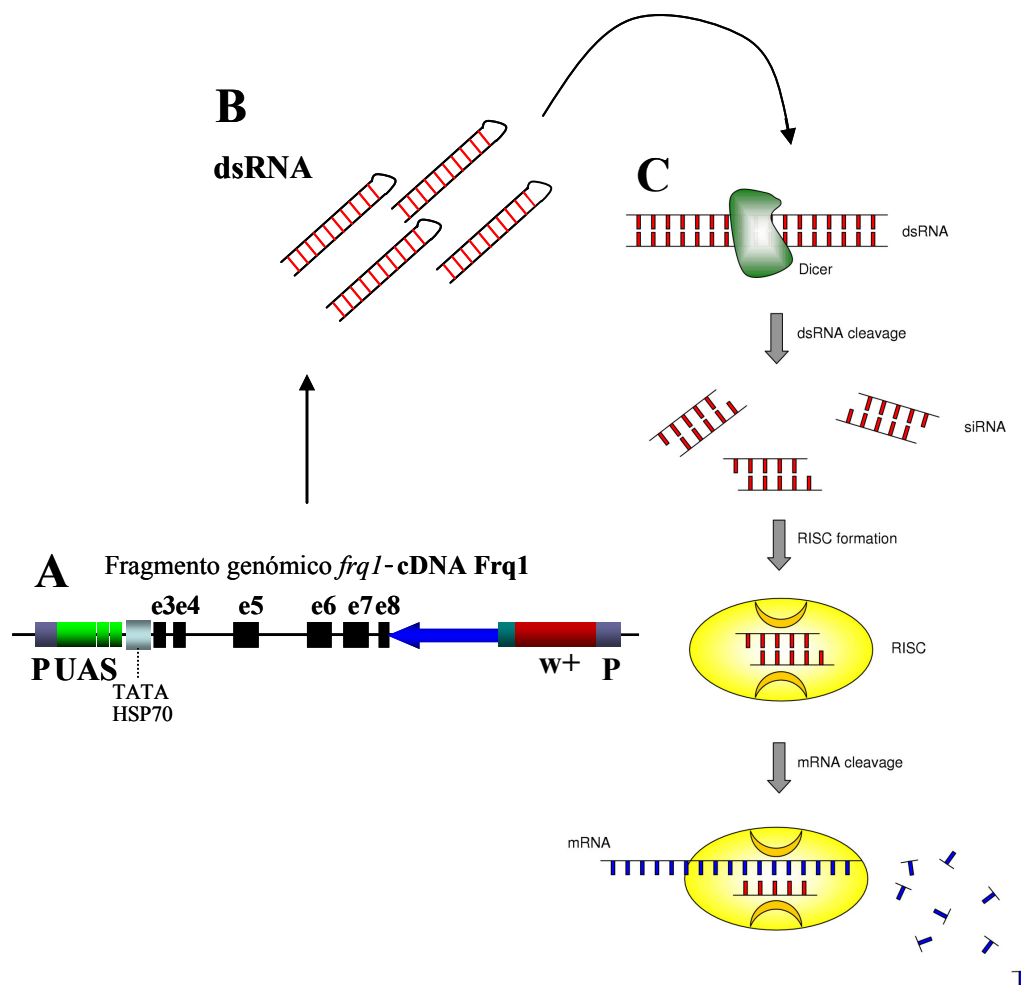


Figura R-9. Esquema de la construcción de RNAi y mecanismo de acción. A) El fragmento genómico de 2,3 Kb más el cDNA de *frq1* en orientación reversa se clonaron en el vector pUAS_t. Tal y como se describe en el texto, se generaron líneas UAS-RNAi, con esta construcción. Éstas se cruzan con la línea Gal-4 para dirigir su expresión y el procesamiento de los intrones que contiene el fragmento genómico formándose dsRNA de *frq1* en los lugares donde se expresa el Gal-4 (B). La presencia de las moléculas dsRNA dispara su procesamiento por el enzima Dicer y el complejo RISC, lo que termina con la degradación de los mRNA nativos (C).

Tabla 6. Líneas transgénicas de RNAi.

Nombre	Genotipo	Cromosoma inserción
UAS-RNAi ^{43C}	<i>yw</i> , P[(w+)UAS-RNAi ^{43C}]	1
UAS-RNAi ^{51B}	<i>yw</i> ; P[(w+)UAS-RNAi ^{51B}]/CyO	2
UAS-RNAi ^{38A}	<i>yw</i> ; P[(w+)UAS-RNAi ^{38A}]/CyO	2
UAS-RNAi ^{17C}	<i>yw</i> ; P[(w+)UAS-RNAi ^{17C}]	3

4. ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS LÍNEAS TRANSGÉNICAS.

4.1 Cuantificación de los niveles de expresión de *frq1* o *frq2* en las distintas líneas mediante QRT-PCR. Con el objetivo de comprobar la funcionalidad de las líneas transgénicas, se realizaron experimentos de QRT-PCR con los oligonucleótidos específicos usados en el análisis de desarrollo (**Tabla 2** y Materiales y Métodos). Los oligos o-472 y o-473 se diseñaron de tal forma que son capaces de amplificar el mensajero endógeno, pero sin reconocer el producto transcrito por la construcción UAS-RNAi. Las distintas líneas UAS obtenidas se cruzaron con la línea *tub-Gal4^{LL7}*, que expresa el Gal4 de forma ubicua ya que se encuentra bajo el control del promotor del gen *tubulina*. Como control, se hicieron cruces simultáneos entre las líneas parentales de los experimentales (*tub-Gal4^{LL7}*, UAS-*frq1*, UAS-*frq2* y UAS-RNAi) y la cepa *y w*. Los cruces se mantuvieron a 25°C. De la descendencia se recogieron grupos de 20 adultos de 2 días de edad para su homogeneización y extracción de RNA. En la **Fig. R-10A** se muestran los niveles de expresión obtenidos en las distintas líneas analizadas, relativizados con respecto a los niveles presentes en el control *tub-Gal4^{LL7}/+*. Así, podemos concluir que las líneas UAS-*frq1* sobre-expresan de forma específica el mensajero de Frq1, sin alterar los niveles de Frq2 y viceversa. Para las líneas UAS-RNAi obtenemos una reducción máxima en los niveles de expresión de ambos genes de aproximadamente un 60-70% con respecto a los niveles del control. Es interesante recalcar que aunque la construcción UAS-RNAi contiene únicamente secuencias de *frq1*, el efecto de interferencia ocurre contra los mensajeros de *frq1* y *frq2*, generando bajo estas condiciones una situación hipomorfa de ambos genes. Esto puede deberse a la alta similitud entre las secuencias de los dos genes *frq* en su zona codificadora (83% de identidad nucleotídica), lo que puede producir el reconocimiento del mRNA de *frq1* y *frq2* por parte de los siRNAs y el anclaje y posterior degradación por el complejo RISC.

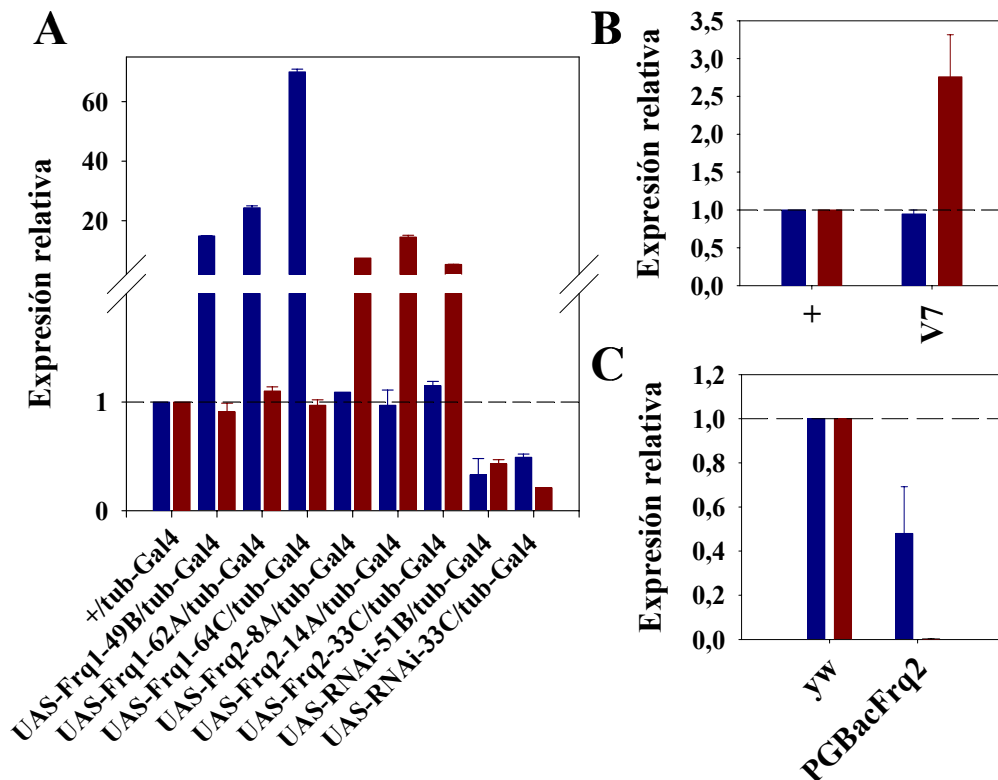


Figura R-10. Cuantificación de los niveles de *frq1* y *frq2* en las distintas líneas transgénicas y mutantes mediante QRT-PCR. A) Expresión relativa de los niveles de mRNA de *frq1* (azul) y *frq2* (rojo) en adultos que expresan las construcciones UAS-*frq1*, UAS-*frq2* o UAS-RNAi bajo el control de *tub-Gal4*. Los valores están normalizados frente a los niveles de mRNA presentes en individuos control; + / *tub-Gal4*. B) Valores relativos de expresión de ambos genes en adultos mutantes V7. Nótese que los niveles de *frq2* son tres veces superiores a los valores de expresión de la cepa CS, mientras que los niveles de *frq1* no varían. C) Niveles de expresión de *frq1* y *frq2* en la línea PGBac-Frqf06131. Observamos que esta inserción provoca la eliminación de la expresión de *frq2* y la reducción de aproximadamente el 50% en los niveles de *frq1*. Los histogramas representan la media de 2-4 experimentos de QRT-PCR. Barras de error = \pm sem.

4.2 Cuantificación de los niveles de *frq1* y *frq2* en las cepas V7 y P_{Bac}{(w+), *frq2*[f06131]}. Los datos disponibles indicaban que los mutantes V7 presentaban niveles anormalmente altos de *frq* (Pongs et al., 1993), sin embargo estos trabajos se hicieron sin conocer la existencia de *frq2* y su cercanía al punto de ruptura V7. Además, la determinación de los niveles de proteína se realizó con anticuerpos que, dada la alta similitud entre las dos proteínas, probablemente no discriminaran entre ambas. Con el objetivo de determinar cual de los dos genes está afectado por el punto de translocación V7 se realizaron ensayos de QRT-PCR. Los resultados obtenidos indican que los niveles de expresión de *frq1* en los mutantes V7 son normales, mientras que *frq2* se expresa 3 veces más que en el control (Fig. R-10B). Más recientemente, hemos identificado una

línea que posee un elemento P insertado en el primer intrón de *frq2*; w^{1118} , PBac{(w^+), *frq2*[f06131]}. Quisimos comprobar si la inserción de este elemento P afecta a la expresión de *frq2* y/o *frq1*. Para ello hicimos ensayos de QRT-PCR a partir de extractos RNA de adultos. Los resultados demuestran que esta inserción provoca la eliminación de la expresión de *frq2*, además produce una reducción en la expresión de *frq1* de aproximadamente el 50% (**Fig. R-10C**).

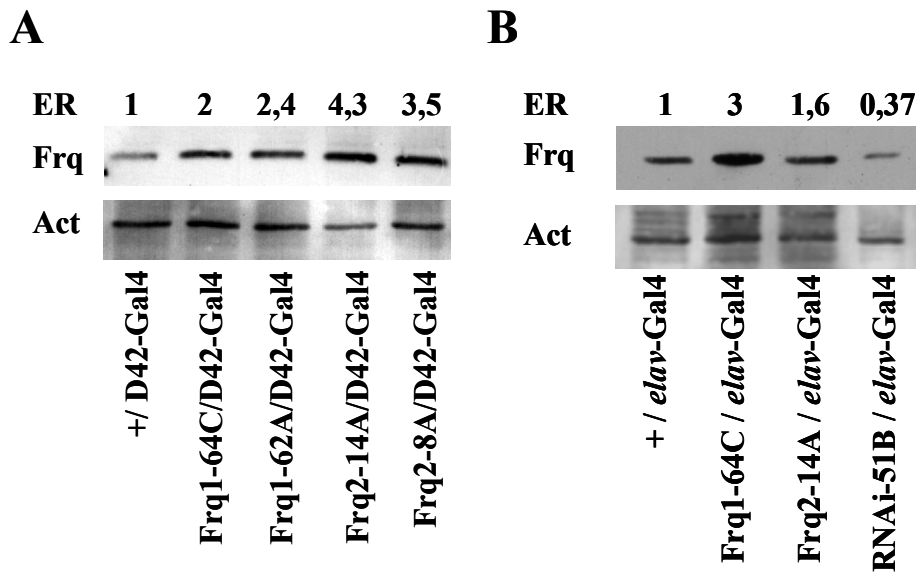


Figura R-11. Cuantificación de los niveles de Frq1 y Frq2 en las distintas líneas transgénicas mediante Western-blot. Los extractos de cabezas de adultos de los genotipos señalados se corrieron en un gel de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a una membrana para su análisis usando los anticuerpos anti-Frq y anti-Actina. ER = valores de expresión relativa; se calcularon tras la densitometría de cada banda y su normalización con respecto a los valores del control. La señal de Actina se utilizó como control endógeno de carga. **A)** resultados obtenidos cuando las construcciones UAS son expresadas bajo el control de D42-Gal4. **B)** resultados obtenidos usando la línea *elav*-Gal4.

4.3 Cuantificación de los niveles de las proteínas Frq1 o Frq2 en las líneas transgénicas. Una vez realizado el análisis cuantitativo de los niveles de mensajero, quisimos comprobar los niveles correspondientes de proteína cuando usamos distintas líneas Gal4 neurales. Las líneas usadas fueron *elav*-Gal4^{C155} y D42-Gal4. Se realizaron ensayos de Western-blot usando homogeneizados de cabezas de los distintos genotipos.

Para la detección de Frq se usó un anticuerpo generado en conejo contra el péptido QPQTEDENTPQKR de Frq2 (ver Materiales y Métodos) a una dilución 1:1000 en TBST. Como control de carga endógeno se usó el anticuerpo anti-actina (JLA20, DSHB, US) hecho en ratón a una dilución 1:1000 en TBST. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. R-11**. Las cantidades relativas de proteína se calcularon mediante densitometría usando el programa *Quantity One* (Bio-Rad). En cada caso los valores obtenidos para la señal del anti-Frq fue normalizada frente a los valores del control endógeno (anti-actina) y se relativizaron con respecto al genotipo control. Los resultados obtenidos demuestran que cuando sobreexpresamos Frq1 o Frq2, obtenemos un incremento de 2-4 veces en la cantidad de Frq. Sin embargo, el aumento obtenido de la banda de Frq (~22 KDa) cuando sobre-expresamos Frq1 o Frq2 indica que, a pesar de estar diseñado contra un péptido de Frq2, nuestro anticuerpo no discrimina entre ambas proteínas. Por otro lado, observamos que la reducción máxima total (de Frq1 y Frq2) obtenida usando la construcción UAS-RNAi es del 60%. En todos los casos observamos una cantidad remanente de Frq que corresponde con aproximadamente un 40% de los niveles de proteína encontrados en individuos control. Así pues, podemos concluir que las herramientas disponibles generan condiciones de exceso de Frq1 o Frq2 (mediante el uso de las líneas UAS-*frq1* o UAS-*frq2*) o condiciones hipomorfas para ambas proteínas (mediante el uso de las líneas UAS-RNAi), no pudiendo sin embargo generar una condición nula para ambos genes.

5. FENOTIPOS DE EXCESO Y ATENUACIÓN FUNCIONAL DE *frq1* Y *frq2*.

El análisis fenotípico se realizó en la unión neuromuscular (NMJ) de las fibras musculares 6 y 7 del tercer segmento abdominal de larvas de tercer estadio. Estas fibras son inervadas por las motoneuronas MN6/7-Ib y MNSN-Is, las cuales forman botones de tipo Ib o Is. Podemos identificar ambos tipos de botón a nivel morfológico mediante microscopia confocal. Para dirigir la expresión de las distintas construcciones UAS en estas motoneuronas se han utilizado principalmente dos líneas Gal4; D42-Gal4 y *elav*-Gal4^{C155}. Para confirmar el patrón de expresión de estas líneas, se cruzaron con líneas transgénicas que expresan el gen de la β -Galactosidasa (**Fig. R-12AB**) o con líneas que expresan el marcador mitocondrial mit-GFP (**Fig. R-12CD**) bajo el control de las secuencias UAS. Las dos líneas Gal4 usadas dirigen la expresión de forma específica

en las motoneuronas larvarias. En la **Fig. R-12D** se observa un detalle de las motoneuronas 6 y 7. Esta imagen se obtuvo de individuos D42-Gal4/UAS-mit-GFP, lo que confirma el dominio de expresión de la línea D42-Gal4 en dichas motoneuronas.

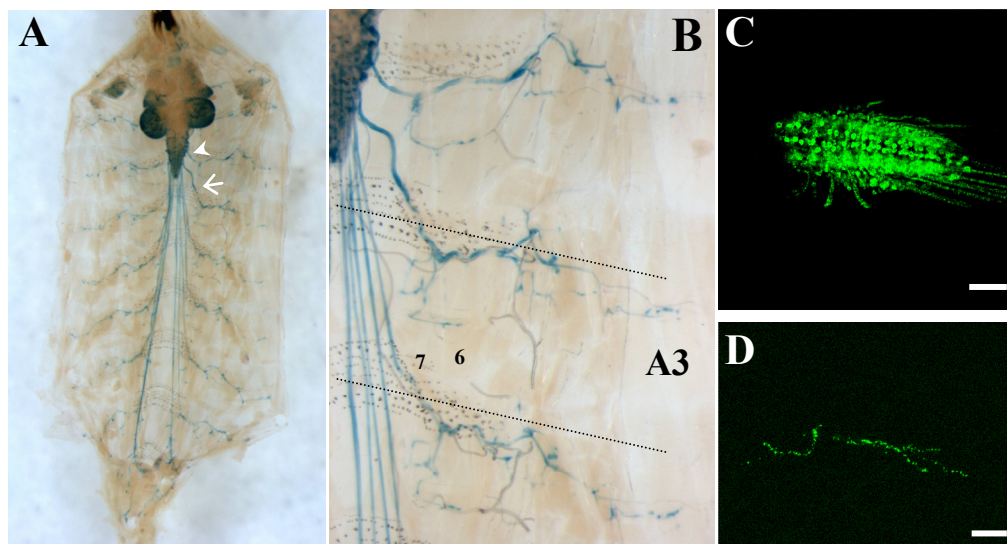


Figura R-12. Patrón de expresión de las líneas Gal4 usadas para el análisis fenotípico; A) Visualización de la actividad β Gal de larvas de tercer estadio *elav-Gal4/UAS-lacZ*. La expresión de la línea *elav-Gal4* es específica y ubicua en el SNC. Los somas de motoneuronas, se localizan en el Ganglio Ventral (punta de flecha). Éstas proyectan sus axones hacia las fibras musculares. En la imagen se señala con una flecha los nervios que proyectan al tercer hemisegmento abdominal derecho. **B)** Imagen ampliada del tercer segmento abdominal (A3) derecho. Nótese como el marcaje usado identifica los axones que inervan las fibras musculares 6 y 7. **C)** Ganglio Ventral de larvas UAS-mito-GFP/D42-Gal4. La construcción UAS-mito-GFP expresa un marcador mitocondrial fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP). Se observa señal GFP en la mayoría de las motoneuronas que inervan los músculos de la pared larvaria. Barra = 40 μ m. **D)** Detalle de la NMJ de los músculos 6 y 7 del tercer segmento abdominal de larvas UAS-mito-GFP/D42-Gal4. Barra = 20 μ m.

5.1 Análisis morfológico. Estudios previos del laboratorio demuestran que la sobreexpresión de *frq* afecta a la morfología de la NMJ. En ellos se observó que los individuos *V7* y *T-hs-Frq* presentan una reducción en el número de varicosidades y en el tamaño de las ramificaciones de las motoneuronas que inervan los músculos 12-13 (Angaut-Petit et al., 1998). En este trabajo analizamos el número de botones de tipo Ib y Is presentes en las NMJ que inervan las fibras musculares 6 y 7 bajo condiciones de

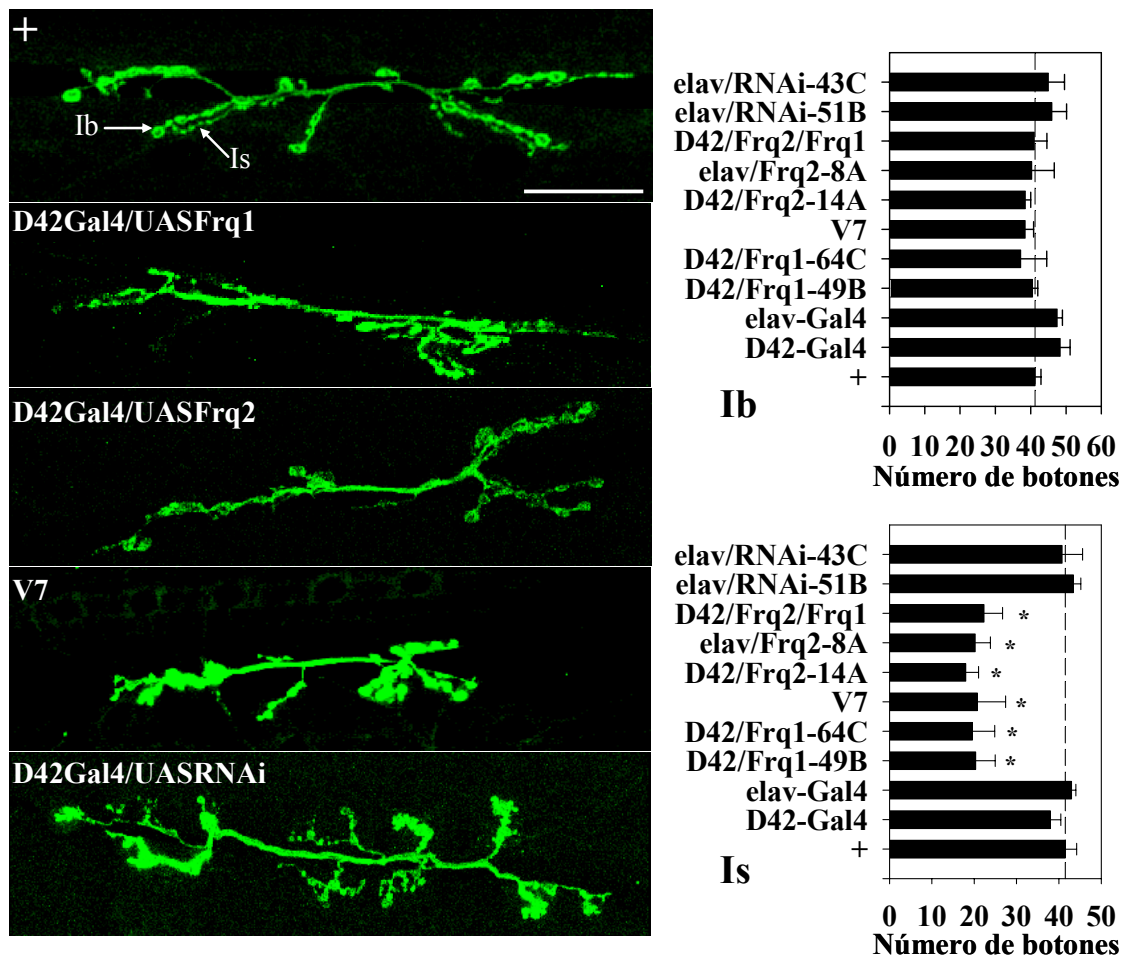


Figura R-13. Análisis del número de botones Ib y Is en mutantes de sobreexpresión o de reducción de Frq1 y Frq2. A) Tinción de las NMJ de las fibras 6/7 de larvas de tercer estadio usando el anticuerpo anti-HRP conjugado con el fluoróforo FITC. + = control Canton-S. Barra = 100 μ m. B) Promedio del número de botones Ib (panel superior) o Is (panel inferior) en cada genotipo analizado. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce una reducción en el número de botones de tipo Is. Sin embargo, la reducción de los niveles de Frq1 y Frq2 mediante el uso del RNAi no afecta al número de botones. (Barras de error = \pm SD. N=6, (*) indica $P < 0,01$).

exceso y falta de *frq1* y/o *frq2*. Para ello se realizaron tinciones de la NMJ de larvas de tercer estadio usando el anticuerpo anti-HRP. Este anticuerpo se ha usado en muchos estudios como marcador neuronal en *Drosophila* (Cheung et al., 1999; Jan and Jan, 1982). Las imágenes de la NMJ de las fibras 6/7 del tercer segmento abdominal se captaron a un aumento 100x mediante microscopía confocal. Tras su posterior análisis con el programa ImageJ se obtuvieron los resultados mostrados en la **Fig. R-13**. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce una disminución significativa del número de botones. Esta reducción ocurre específicamente en los botones de tipo Is (**Fig. R-13B**). No encontramos diferencias significativas en el número de botones cuando reducimos los niveles de Frq1 y Frq2 mediante el uso de las líneas RNAi.

5.2 Análisis fisiológico. Los fenotipos electrofisiológicos de *V7* y de los transgénicos *T-hs-frq* han sido caracterizados por nuestro laboratorio y otros grupos. Así, se ha descrito que a frecuencias de estimulación altas (>2 Hz), se produce un incremento en la respuesta post-sináptica denominado *Large Facilitated Response* (LFR). También se ha descrito en estos mutantes un aumento de la facilitación cuando se estimula con un protocolo de pares de pulsos (Pongs et al., 1993; Rivosecchi et al., 1994). Sin embargo, estos estudios se realizaron en solución *standard* (solución A en (Jan and Jan, 1976) que hoy se sabe no mantiene estable la preparación a temperatura ambiente. Además, las concentraciones externas de Ca^{2+} usadas, 0,12 mM, no corresponden con las fisiológicas de *Drosophila* ($1,5 \pm 0,7$ mM)(Stewart et al., 1994). En los últimos años se han desarrollado soluciones que mantienen la preparación estable durante más tiempo debido a que las concentraciones iónicas y la composición de las mismas es más parecida a las encontradas en la hemolinfa, por este motivo se les ha denominado soluciones *Haemolymph-like* (HL) (Stewart et al., 1994). Por último, el descubrimiento de *frq2* justifica el estudio fenotípico diferencial de los mutantes de exceso o falta de función de ambos genes. Para estos análisis hemos usado las soluciones HL-3 o HL-6 descritas en (Stewart et al., 1994) a una concentración externa de Ca^{2+} de 1-2 mM.

5.2a Registros intracelulares. Se realizaron registros intracelulares del músculo abdominal 6 de larvas de tercer estadio que sobre-expresan *frq1*, *frq2* o *frq1 y frq2* e hipomorfos para *frq1* y *frq2*. Estas situaciones experimentales se obtuvieron cruzando la cepa D42-Gal4 con las distintas líneas transgénicas UAS generadas. Como controles, se registraron la cepa salvaje CS, y los parentales correspondientes. No se encontraron diferencias significativas entre CS y el resto de líneas parentales (datos no mostrados), con lo que de aquí en adelante sólo se muestran los resultados obtenidos en los controles CS y el control D42/+. La amplitud de la respuesta evocada (EJP) a bajas frecuencias de estimulación (1 Hz), en los individuos que sobre-expresan Frq1, Frq2 o ambas a la vez es significativamente superior que los controles (**Fig. R-14AB**). No se detectaron diferencias en la amplitud de los EJP entre los hipomorfos para ambos genes y los controles. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la frecuencia y amplitud de los eventos espontáneos (mEJPs) en ninguno de los genotipos analizados (**Fig. R-14 CD**). Estos resultados indican un incremento de la respuesta post-sináptica en fibras que son inervadas por motoneuronas cuyos niveles de Frq son superiores a lo normal. Sin

embargo, hemos demostrado anteriormente que estas motoneuronas también presentan una reducción en el número de botones. Una explicación a este fenómeno es que los individuos que sobreexpresan Frq liberen más cantidad de neurotransmisor por botón frente a un estímulo. Para testar esta hipótesis y gracias a la colaboración con el laboratorio del Prof. Harold L. Atwood en la Universidad de Toronto (Canadá), se realizaron registros extracelulares de botones individuales de tipo Ib o Is.

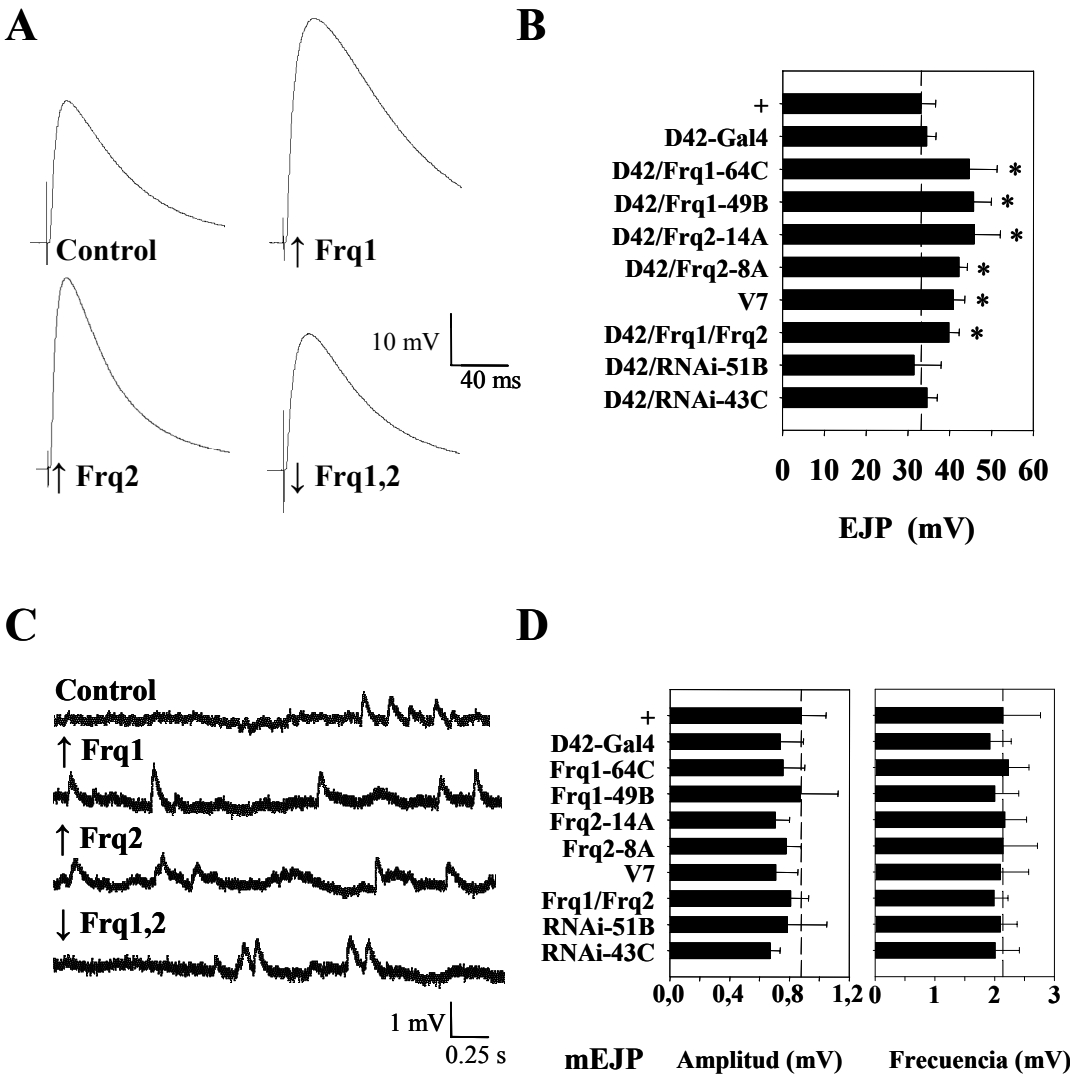


Figura R-14. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce un aumento de los EJPs. **A)** Registros representativos de individuos control, que sobreexpresan Frq1, Frq2 o con niveles reducidos de ambas. Cada caso representa la media de 50 EJPs. **B)** Histogramas con los promedios de las respuestas post-sinápticas de la fibra muscular 6 tras ser estimuladas por motoneuronas con los niveles de Frq alterados. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce un incremento significativo en la amplitud de la respuesta ($P < 0,01$ indicado con un asterisco. $N = 5-9$). Barras de error = \pm SD. **C)** Eventos espontáneos de liberación (mEJP) representativos de los genotipos analizados. **D)** Valores promedio de la amplitud y frecuencia de las mEJP. No se observan diferencias significativas entre los genotipos analizados ($N=4-6$). Barras de error = \pm SD.

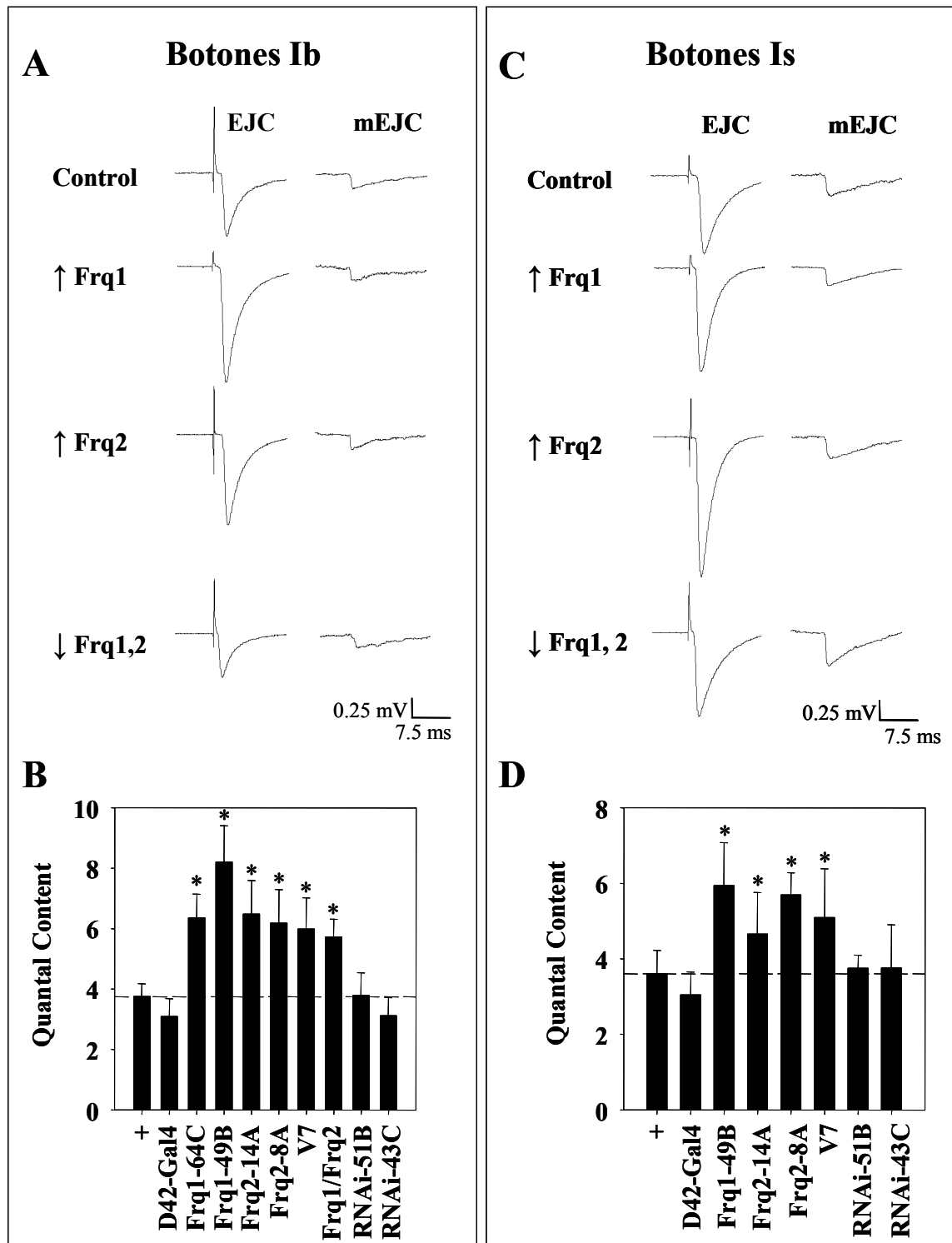


Figura R-15. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 provoca un aumento en la liberación por botón. **A)** y **C)** Registros focales extracelulares en botones de tipo Ib y Is respectivamente. Cada figura representa la media de 50 EJCs y 10 mEJCs. **B)** y **D)** Histogramas con los promedios del *Quantal Content* calculados para cada genotipo analizado. Éste se calculó a partir de los datos obtenidos en los registros focales (media EJC / media mEJC) en botones Ib o Is. Cuando sobreexpresamos Frq1 o Frq2 se produce un incremento del *Quantal Content* de 1,8-2,6 veces en botones de tipo Ib (**B**) y de 1,5-1,9 veces en botones Is (**D**). (*) = valores de $P < 0,01$. $N = 6-12$, barras de error = \pm SD.

5.2b Registros extracelulares. Al igual que para los registros intracelulares, se usó la línea D42-Gal4 para dirigir la expresión de las construcciones UAS. Los experimentos se realizaron bañando las muestras con solución HL-6 (1 mM Ca^{2+}) y estimulando el nervio a 2 Hz. Los resultados obtenidos indican que la sobre-expresión de Frq1 o Frq2 causa un incremento de dos veces en el contenido cuántico de botones de tipo Ib (**Fig. R-15AB**) y de aproximadamente 1,4 veces en botones de tipo Is (**Fig. R15 C y D**). No se detectaron cambios significativos en los hipomorfos para *frq1* y *frq2* con respecto a los controles. Estos resultados demuestran que el aumento de los EJPs en individuos que sobreexpresan *frq* se debe a un incremento de la liberación de NT por botón.

5.2c Estimación de la liberación de neurotransmisor por sinapsis. Estudios previos demuestran que el número de sinapsis/zonas activas pueden afectar a la cantidad de liberación de neurotransmisor (Atwood and Karunanithi, 2002). Decidimos comprobar si los efectos en la liberación por botón provocados por el aumento de la expresión de Frq1 o Frq2, se deben a un cambio en el número de sinapsis por botón. Para ello, hemos usado el anticuerpo nc82 que reconoce la proteína Bruchpilot (BRP). A pesar de que ha sido usado ampliamente como marcador específico de sinapsis (Bao et al., 2005; Laissue et al., 1999; Martin-Pena et al., 2006; Wucherpfennig et al., 2003), en el momento de realizar este estudio se desconocía la localización a nivel ultra-estructural de este marcaje. Con este objetivo se realizó una inmuno-tinción contra nc82 en larvas de tercer estadio. Posteriormente, el material fue procesado para su análisis al microscopio electrónico (Materiales y Métodos). En la **Fig. R16A-B** se muestran los resultados obtenidos. Aunque debido a la metodología empleada no podemos observar la localización precisa del marcaje (dentro de la zona activa), sí es claro que la señal es específica de la parte pre-sináptica del botón, correspondiéndose con los lugares donde se localizan las zonas activas.

Así, usamos este anticuerpo para analizar el número de sinapsis por botón de tipo Ib o Is en condiciones de exceso y falta de Frq1 y/o Frq2. Para ello se realizaron dobles tinciones de NMJ de larvas de tercer estadio, mediante anti-HRP y nc82 (**Fig. R16C**). Tras la captura de las imágenes mediante microscopía confocal, se contaron el número de sinapsis, como puntos nc82 positivos, en botones de tipo Ib (de aproximadamente 5 μm de diámetro) y tipo Is (de aproximadamente 2 μm de diámetro) situados en el extremo de las ramificaciones, al igual que se hizo para los registros extracelulares. Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. R16D**. No existen

cambios en el número de sinapsis presentes en botones de tipo Ib o Is, entre individuos que sobre-expresan Frq1 o Frq2 y sus controles (Tipo Ib; $33,4 \pm 5,6$ en CS, $35,54 \pm 3,4$ en Frq1-64C, $39,25 \pm 3,9$ en Frq2-14A. Tipo Is; $11,67 \pm 3,68$ en CS, $11,61 \pm 2,3$ en Frq1-64C, $11,25 \pm 2,48$ en Frq2-14A) (**Fig R-16 D,E**).

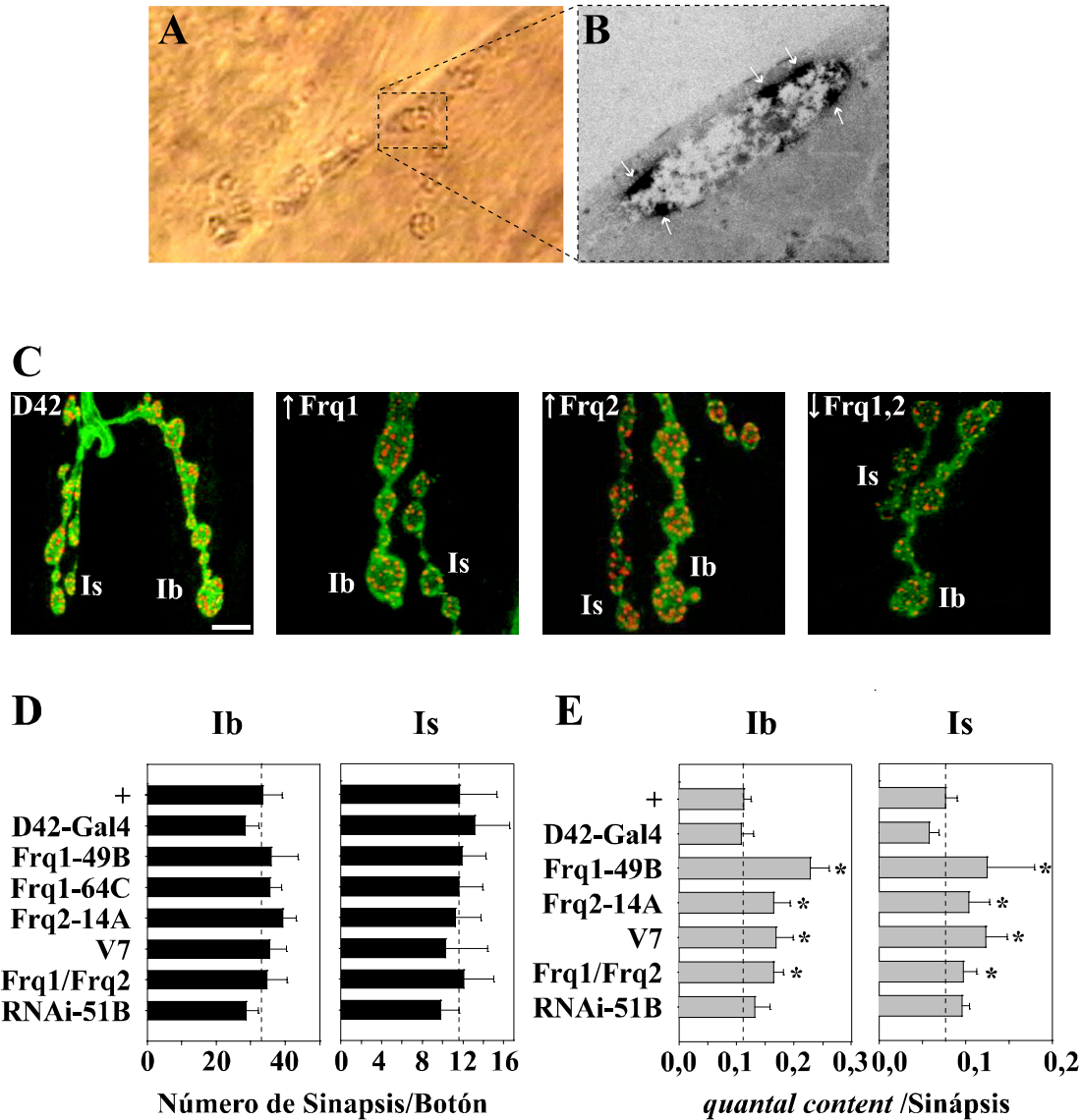


Figura R-16. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce un incremento en la liberación por sinapsis. A-B) Localización del marcaje nc82. A) Sección semifina de los músculos de la pared larvaria, teñidos con nc82 y revelado con DAB. B) Botón sináptico visualizado al microscopio electrónico (15000x). Se aprecia el marcaje del nc82 en las zonas activas (flechas blancas). C) Doble inmunotinción usando antiHRP (verde) y nc82 (rojo) de las NMJ de larvas control, que sobreexpresan Frq1 o Frq2 o hipomorfas para ambas proteínas. Barra = 4µm. D) Contaje del número de sinapsis por botón de tipo Ib o Is. no existen diferencias en el número de sinapsis por botón entre los genotipos analizados. N = 12-16. E) Los valores del Quantal Content obtenidos anteriormente para cada tipo de botón se dividieron entre el número de sinapsis por botón para calcular la liberación de neurotransmisor por sinapsis en botones Ib o Is. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 provoca un aumento en la liberación por sinapsis en botones Ib y Is. Barra error = SD.

Tampoco existen cambios significativos en los hipomorfos de Frq1 y Frq2 (Tipo Ib; $28,70 \pm 3,58$ y Tipo Is $9,80 \pm 1,83$ en RNAi-51B). Para calcular la liberación por sinapsis en cada tipo de botón dividimos el contenido cuántico obtenido en los registros extracelulares entre el número de sinapsis por botón calculado mediante el uso del anticuerpo nc82. Como se muestra en la **Fig. R16E**, existe una mayor liberación por sinapsis en los dos tipos de botones cuando sobre-expresamos Frq1 o Frq2; mientras que no detectamos cambios significativos cuando reducimos los niveles de ambas proteínas usando las líneas de RNAi.

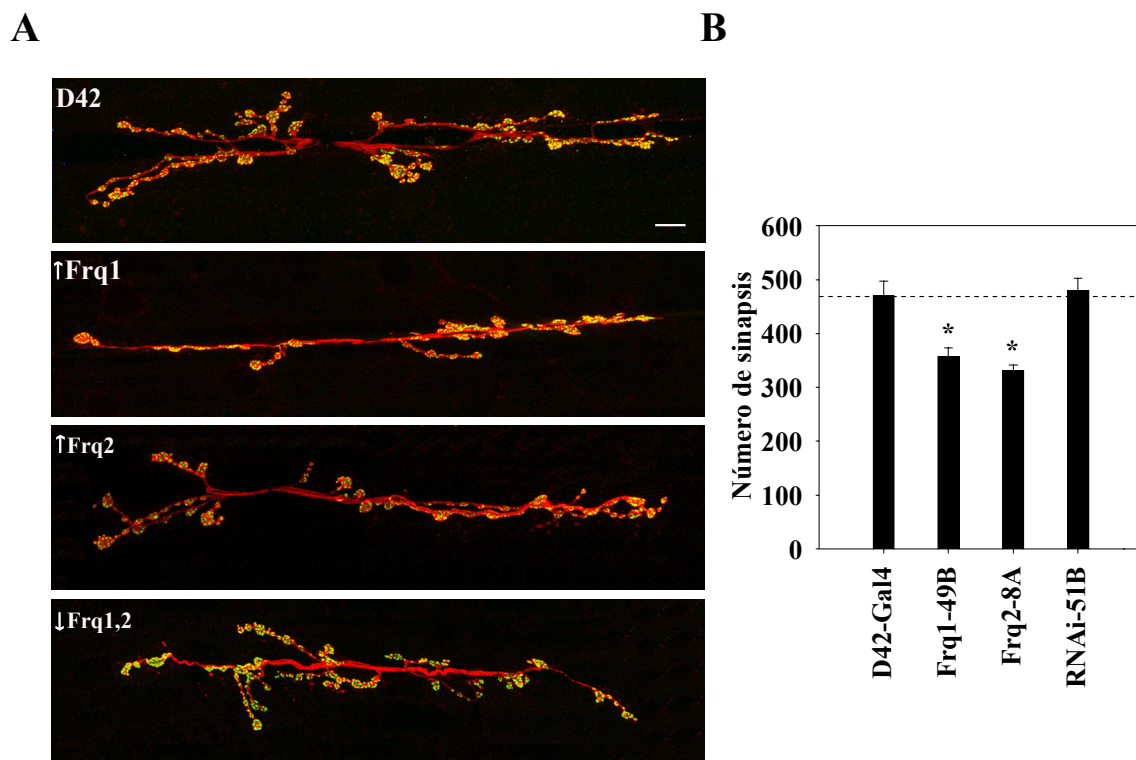


Figura R-17. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce un descenso en el número total de sinapsis. **A)** Doble marcaje de la membrana axonal con anti-HRP (rojo) y de sinapsis con nc82 (verde) en NMJ de larvas control (D42-Gal4), que sobreexpresan Frq1, Frq2 o que reducen los niveles de ambas. Barra = 10 μ m. **B)** Histogramas que representa la media del número total de sinapsis en las fibras 6/7 del tercer segmento abdominal. Se produce un descenso en el número de sinapsis cuando se sobreexpresa Frq1 o Frq2, mientras que no existen diferencias entre individuos hipomorfos y los controles. N= 7-9, (*) indica $P < 0,05$. Barras de error = s.e.m.

5.3 Efectos de Frq1 y Frq2 en el número total de sinapsis. Puesto que la sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce una reducción en el número de botones, pero sin afectar al número de sinapsis por botón, los individuos que sobreexpresan Frq mostrarían una reducción en el número global de sinapsis que se forman en las fibras

musculares 6/7. Para testar esta hipótesis se realizaron dobles inmuno-tinciones con anti-HRP y nc82 de las NMJ de larvas control, que sobreexpresan Frq1 o Frq2 y que tienen reducidos los niveles de Frq1 y Frq2. Se tomaron imágenes confocales seriadas a una magnificación de 100x de la NMJ en los músculos 6/7 del segmento abdominal tercero. Las sinapsis se contaron como puntos nc82 positivos en cada sección de confocal. Los resultados obtenidos indican una reducción significativa en el número total de sinapsis cuando se sobreexpresa Frq1 o Frq2, mientras que no existen cambios entre los individuos hipomorfos para ambas Frqs y el control (**Fig. R17A-B**). Estos resultados sugieren que la reducción observada en la superficie de innervación, como número de botones, de individuos que sobreexpresan Frq (**Fig. R13**) produce una reducción en el número global de sinapsis que se forman (**Fig. R17**), sin embargo la liberación de NT por sinapsis es superior (**Fig. R16**), lo que provoca que la respuesta global que se produce en la célula post-sináptica sea superior (**Fig. R14**).

6. GENERACIÓN DE MUTANTES DOMINANTES-NEGATIVOS DE Frq1 Y Frq2 Y ANÁLISIS DE SUS FENOTIPOS.

6.1 El péptido NCS1^{DN} de mamíferos afecta la liberación de neurotransmisor en *Drosophila*. Como hemos visto hasta ahora, la reducción de los niveles de ambas proteínas en un 60% no produce ningún efecto en los fenotipos analizados. Como alternativa a la generación de mutantes de falta de función, existen numerosos casos en la bibliografía en los que la sobreexpresión de una proteína truncada o mutada puntualmente en algún residuo necesario para su función, produce la formación de heterodímeros con la proteína endógena, o alternativamente, interacciones con las dianas de la proteína, secuestrándolas y causando un fenotipo análogo a la ausencia de la proteína (Blanke and Jackle, 2006; Cho and Cepko, 2006; Pilot et al., 2006). A estas formas truncadas de una proteína cuya sobreexpresión causa un fenotipo mutante, se las denomina Dominante Negativo (DN). Estudios realizados en células del Cáliz de Held, han demostrado que los 34 aminoácidos del extremo carboxilo-terminal de NCS-1 actúan como dominante negativo (Tsujimoto et al., 2002). Estos 34 aa forman parte de una cavidad hidrofóbica que podría ser el sitio de unión de Frq con su diana (Bourne et al., 2001). Debido a la alta homología entre Frq y su homólogo de vertebrados NCS-1 y a la amable cesión del péptido-DN de NCS1 por parte del Dr. Jhon C. Roder (Samuel

Lunenfeld Research Institute, Toronto) pudimos realizar experimentos en los que las motoneuronas de larvas control, se cargan con el péptido NCS1^{DN} (ver Material y Métodos). De esta forma comprobamos si éste tenía algún efecto en nuestro sistema experimental. Para ello y en colaboración con el laboratorio del Dr. Harold L. Atwood se realizaron registros extracelulares en botones de tipo Ib de individuos que poseen un fondo genético hipomorfo para ambas Frqs ó que sobre-expresan Frq1 y que habían sido previamente “rellenados” con el péptido-DN. Con los registros obtenidos, y de forma análoga a los experimentos anteriores, se calculó el *quantal content*. Como se observa en la **Fig. R18** la incubación de las preparaciones con el péptido-DN en individuos hipomorfos para Frq1 y Frq2, produce una disminución del 80% en la liberación de neurotransmisor (valores de *quantal content*; 0,86±0,58 en individuos RNAi+pep-DN+Texas-Red (TR), 3,79±0,75 en individuos RNAi sin tratamiento, 3,05±0,74 en individuos RNAi +TR). Además, observamos que el tratamiento con el péptido-DN en individuos que sobreexpresan Frq1 existe una drástica reducción en la liberación de NT (valores de *quantal content*; 3,09±0,59 en individuos control D42-Gal4/+, 8,2±1,2 en individuos que sobreexpresan Frq1 sin tratamiento, 2,3±1,4 en individuos que sobreexpresan Frq1+pep-DN+TR). Es importante resaltar que esta reducción es menos fuerte que cuando lo hacemos sobre un fondo hipomorfo, indicando que la presencia de más cantidad de Frq en el terminal disminuye el efecto del péptido-DN (**Fig R18**). Este resultado indica también que los efectos producidos por el péptido DN se deben al bloqueo funcional de Frq ya que pueden ser rescatados parcialmente cuando se sobreexpresa Frq.

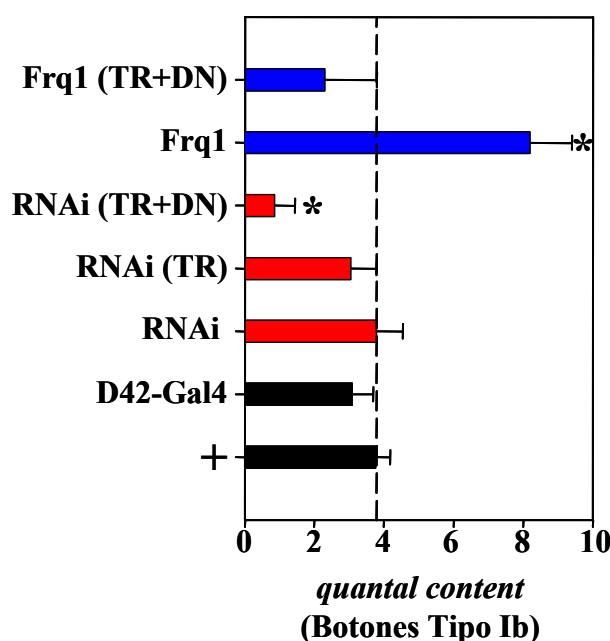


Figura R-18: El péptido NCS1^{DN} inhibe la liberación de neurotransmisor en *Drosophila*. El *quantal content* de los distintos genotipos se calculó a partir de los registros extracelulares realizados en botones de tipo Ib. Como control de internalización celular se utilizó el colorante Texas Red (TR). **Negro** = individuos control +: cepa CS y D42-Gal4. **Rojo** = individuos hipomorfos para *frq1* y *frq2*; UAS-RNAi / D42-Gal4. **Azul** = individuos que sobreexpresan Frq1; UAS-Frq1/D42-Gal4.. Barra de error = ±SD. N= 6. (*) = P<0,01.

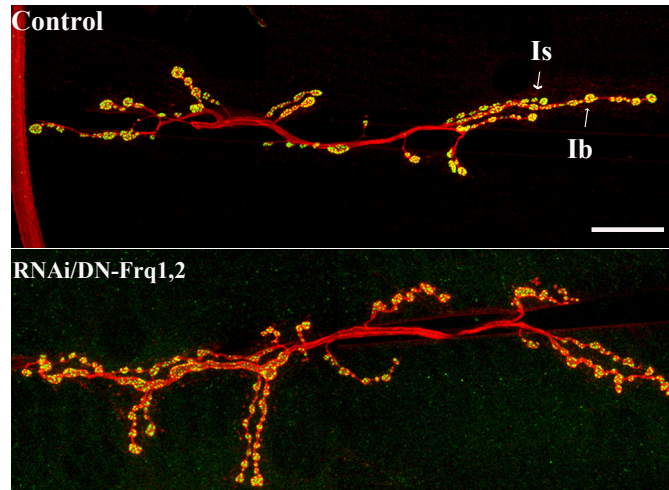
6.2 Generación de líneas DN-Frq1 y DN-Frq2. Una vez comprobada la eficacia del péptido-DN de mamíferos *in vitro*, quisimos comprobar el efecto que produce el péptido equivalente pero fabricado con los 34 aa de la región carboxilo-terminal de las proteínas de *Drosophila* Frq1 y Frq2 expresado *in vivo* mediante el uso del sistema UAS/Gal4. Para ello se generaron las construcciones UAS-DN-Frq1 y UAS-DN-Frq2. En la **Tabla 7** se indican los genotipos completos de las líneas UAS-DN-Frq1 y UAS-DN-Frq2 obtenidas.

Tabla 7. Líneas transgénicas de Dominantes Negativos para Frq1 y Frq2.

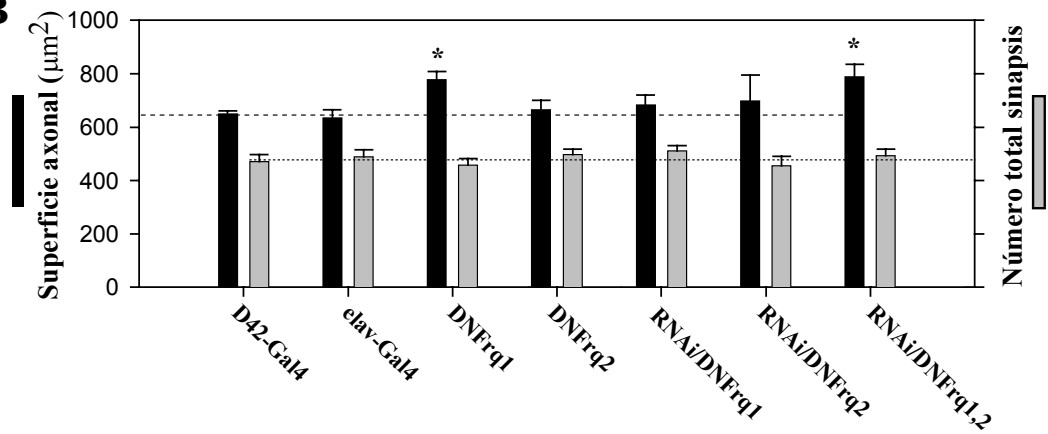
Nombre	Genotipo	Cromosoma inserción
UAS-DN-Frq1 ^{1A}	yw; P[(w+)UAS-DN-Frq1 ^{1A}]/CyO	2
UAS-DN-Frq1 ^{27B}	yw; P[(w+)UAS-DN-Frq1 ^{27B}]/CyO	2
UAS-DN-Frq1 ^{25A}	yw; P[(w+)UAS-DN-Frq1 ^{25A}]	2
UAS-DN-Frq1 ^{31B}	yw; P[(w+)UAS-DN-Frq1 ^{31B}]	3
UAS-DN-Frq1 ^{29B}	yw; P[(w+)UAS-DN-Frq1 ^{29B}]	3
UAS-DN-Frq2 ^{2A}	yw; P[(w+)UAS-DN-Frq2 ^{2A}]	2
UAS-DN-Frq2 ^{2B}	yw; P[(w+)UAS-DN-Frq2 ^{2B}]	3

6.3 Análisis morfológico de las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2. Como hemos descrito anteriormente, Frq1 y Frq2 regulan el tamaño de las ramificaciones y el número de botones que forman las motoneuronas que inervan las fibras musculares 6 y 7. Los experimentos realizados con el péptido-DN de vertebrados no permiten este análisis ya que las preparaciones se incuban con el péptido una vez que alcanzan el tercer estadio larvario, con lo que el desarrollo ocurre sin que se afecte la funcionalidad de ambas Frqs. En cambio, las líneas UAS-DN-Frq1 y UAS-DN-Frq2 sí nos permiten este análisis al expresar *in vivo* dichas construcciones de forma específica en las motoneuronas. Para el estudio morfológico se realizaron tinciones de larvas de tercer estadio, de forma análoga a los casos anteriores, usando el marcador neuronal anti-HRP y el marcador de sinapsis nc82. Las NMJ de las fibras 6 y 7 del tercer segmento abdominal se visualizaron y fotografiaron a una magnitud de 100x mediante microscopía confocal. Posteriormente se calculó el área total que ocupan dichas NMJs (como marcaje positivo para anti-HRP).

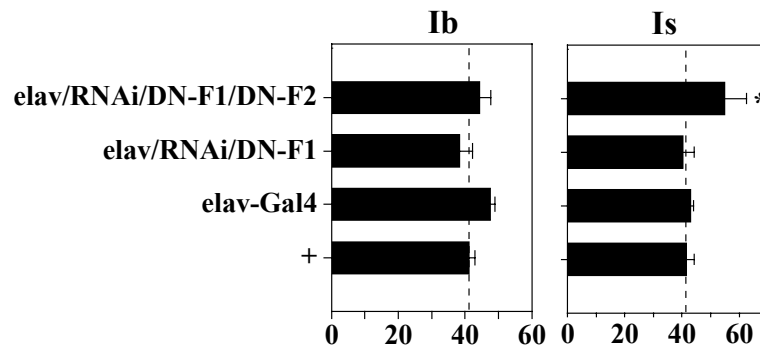
A



B



C



D

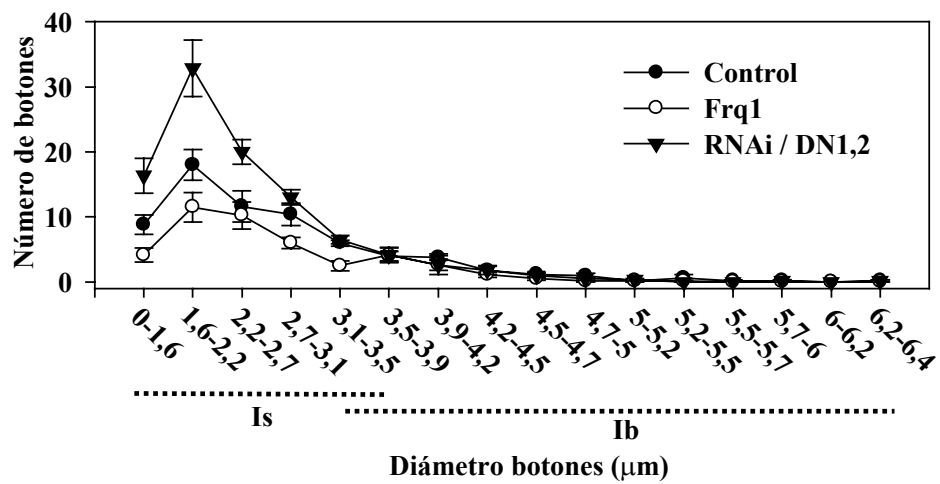


Figura R-19. Frq regula la morfología axonal sin alterar el número total de sinapsis. A)

Imágenes de microscopía confocal de la NMJ que inervan los músculos 6/7 de larvas control y larvas hipomorfas para *frq1* y *frq2* que expresan los dos péptidos DN (RNAi/DN-Frq1,2). Rojo = membrana axonal (anti-HRP), Verde = sinapsis (nc82). Barra = 40 μ m. **B)** Histogramas representando la superficie axonal (negro; eje Y izquierdo) y el número total de sinapsis (gris; eje Y derecho) de NMJ de los distintos genotipos analizados. **C)** Histogramas representando el número de botones de tipo Ib (izquierda) o Is (derecha) de las líneas con diferencias significativas en la superficie axonal calculada en B. **D)** Histograma de los tamaños del pool completo de botones en individuos control (*elav-Gal4*), que sobreexpresan *Frq1* (*elav-Gal4/UAS-Frq1*) y con *Frq1* y *Frq2* bloqueadas funcionalmente (*elav-Gal4/UAS-RNAi/UAS-DNFrq1-Frq2*). Nótese como las diferencias significativas ocurren únicamente en los botones de menor tamaño (Tipo Is). (*) = $p < 0,05$, N= 7-9 larvas. Barras de error = \pm sem

Los resultados obtenidos se muestran en la **Fig. R-19**. La expresión de las formas DN-Frq1 y/o DN-Frq2 en distintos fondos genéticos (normales o hipomorfos para ambos genes) muestra una tendencia a incrementar la superficie de la NMJ, esta tendencia se confirma de forma significativa en los genotipos D42-Gal4/DN-Frq1 y *elav-Gal4/RNAi/DN-Frq1/DN-Frq2*. Sin embargo, cuando analizamos el número de sinapsis totales en las mismas fibras, observamos que en ningún caso existen diferencias significativas con los controles (**Fig. R-19C**). El análisis del número de botones confirma el aumento observado en la superficie de la NMJ para los individuos *elav-Gal4/RNAi/DN-Frq1/DN-Frq2*. En estos individuos el número de botones Is es superior al del control.

En conjunto, estos resultados indican que el bloqueo funcional de Frq afecta a la neuritogénesis de las motoneuronas larvarias de forma contraria a como lo hace el aumento de expresión (**Fig. R19-D**), es decir, produciendo principalmente un incremento en el número de botones de tipo Is, pero sin afectar el número de sinapsis.

6.4 Análisis fisiológico de la expresión crónica de los DN-Frq1 y DN-Frq2. De forma análoga a los experimentos realizados para las líneas de sobreexpresión y de RNAi, se analizaron las consecuencias del bloqueo funcional de Frq en la liberación de neurotransmisor. Para ello se realizaron dos tipos de registros:

6.4a Registros intracelulares de las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2. Se realizaron registros intracelulares en la fibra muscular 6 de larvas que expresan las construcciones DN-Frq1 y/o DN-Frq2 en un fondo genético normal (D42/DN-Frq1, D42/DN-Frq2) o

hipomorfo para ambas proteínas (*elav*/RNAi/DN-Frq1 y *elav*/RNAi/DN-Frq1/DN-Frq2). Los resultados obtenidos muestran una reducción significativa de los potenciales postsinápticos evocados (EJPs) al estimular a frecuencias de 1 Hz y una concentración externa de Ca^{2+} de 1mM (**Fig. R20A-B**). Además, los resultados indican una ligera reducción en la frecuencia media de la liberación espontánea (mEJP) en las dos condiciones de bloqueo funcional testadas, sin embargo esta diferencia no es significativa estadísticamente con respecto a su control parental *elav*-Gal4. El análisis de la amplitud media de los mEJPs, revela una variabilidad mayor entre todas las muestras analizadas, no observándose una tendencia clara que nos permita concluir que este parámetro se afecta por el bloqueo funcional de ambas Frqs (**Fig. R20C**).

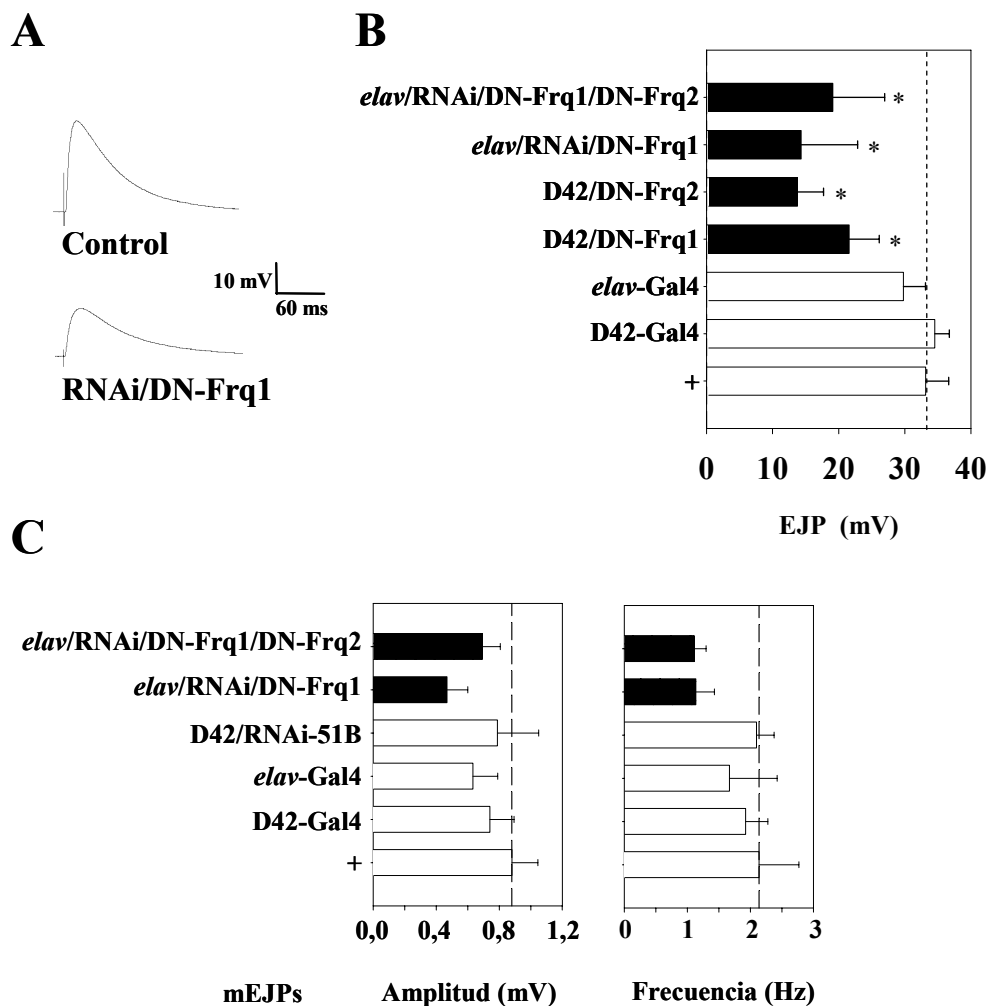


Figura R-20. La falta funcional de Frq afecta la respuesta postsináptica. **A)** Trazas representativas de los potenciales postsinápticos evocados en individuos con niveles funcionales de Frq normales (control) y anulados (*elav*-Gal4/RNAi/DN-Frq1). **B)** Representación de los valores medios en la amplitud de los EJPs registrados en individuos control (blanco) o bloqueados funcionalmente para Frq (negro). **C)** Representación de los valores medios de la amplitud y frecuencia de los potenciales postsinápticos espontáneos (mEJP). N= 7-10. Barras de error = \pm SD. (*) $p < 0,01$.

6.4b Registros extracelulares de las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2. Para comprobar si los efectos observados se deben a la disminución de la cantidad de neurotransmisor liberada frente a un estímulo (*quantal content*) en ambas motoneuronas, se realizaron registros extracelulares focales en botones de tipo Ib y Is de larvas *elav/RNAi/DN-Frq1* y *elav/RNAi/DN-Frq1/DN-Frq2*. Las condiciones de experimentación y los cálculos del *quantal content* se realizaron igual que para el apartado 5.2b. Los resultados indican que, al anular funcionalmente Frq1 o Frq2, se produce una fuerte reducción de la liberación de neurotransmisor en ambos tipos de botón (Ib y Is) (Fig. R21).

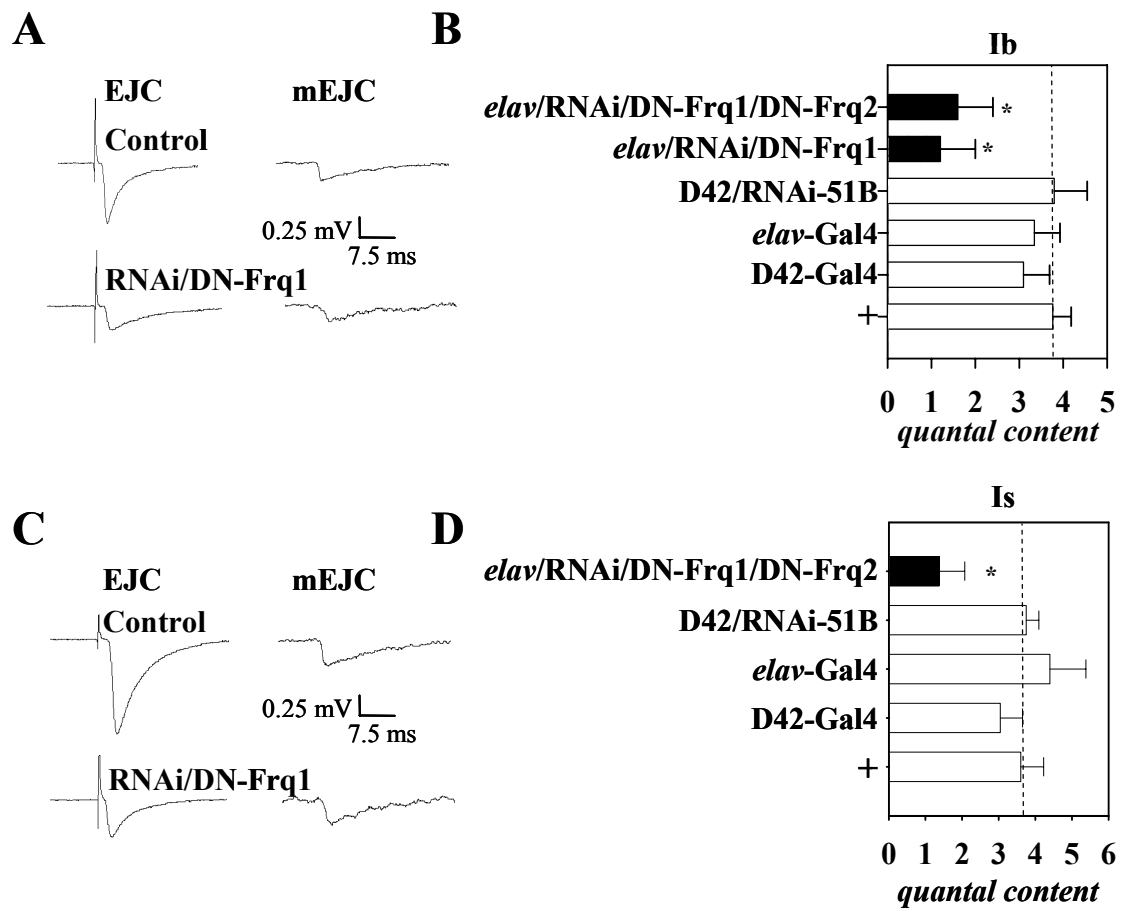


Figura R-21. Análisis de la cantidad de liberación por botón en las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2. A,C) Trazas representativas de las corrientes postsinápticas evocadas (EJC) o espontáneas (mEJC) registrados en botones de tipo Ib (A) o Is (C). Se utilizaron larvas control (CS; +) o que expresan el DN-Frq1 en un fondo genético hipomorfo para Frq (RNAi/DN-Frq1). B, D) Representación de los valores de *quantal content* por botón de tipo Ib (B) o Is (D). El *quantal content* se calculó dividiendo la amplitud media de las EJC entre la amplitud media de las mEJC en individuos control (blanco) o con Frq bloqueadas funcionalmente (negro). N= 7-10. Barras de error = \pm SD. (*) = $p < 0.01$.

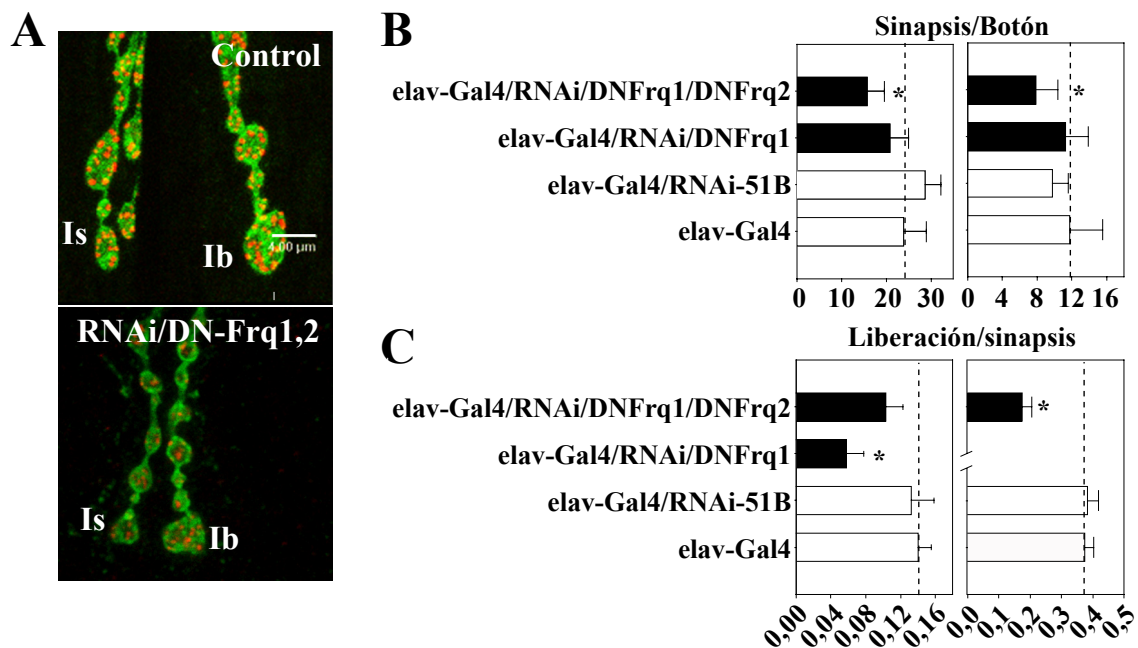


Figura R-22. Estimación de la liberación por sinapsis en las líneas DN. A) Doble tinción, usando el marcador neuronal (anti-HRP; verde) y el marcador sináptico (nc82; rojo), de motoneuronas control (imagen superior) y que expresan los DN-Frq1 y DN-Frq2 en un fondo hipomorfo para Frq (imagen inferior). Barra = 4 μm. B) Histogramas representando el número medio de sinapsis/botón en botones de tipo Ib o Is. C) Histogramas representando los valores medios de *quantal content* / sinapsis. Los controles están representados en blanco mientras que las situaciones de bloqueo funcional de Frq se representan en negro. N = 7-10 larvas. Barras de error = ±SD. (*) = $p < 0,01$.

6.4c Estimación de la liberación por sinapsis en las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2.

Los resultados obtenidos indican que Frq modula la cantidad de neurotransmisor que se libera en los dos tipos de botones. Como indicábamos para el estudio de las líneas de sobreexpresión, una causa de este efecto puede ser que la anulación crónica de Frq durante el desarrollo produzca una disminución en el número de sinapsis/zonas activas por botón y debido a esto la liberación por botón sea menor. Para testar esta hipótesis hemos estimado la cantidad de liberación por sinapsis dividiendo el *quantal content* por botón calculado anteriormente entre el número de sinapsis por botón. Para ello se calculó el número medio de sinapsis / botón, eligiendo botones de tamaño y localización similar a los usados para hacer los registros (5 μm de diámetro para los botones de tipo Ib y 2 μm para los de tipo Is). Esto se realizó en larvas control (*elav-Gal4* ó *elav-Gal4/RNAi*), así como en larvas que expresan el DN-Frq1 y/o el DN-Frq2 sobre un fondo genético hipomorfo (*elav/RNAi/DN-Frq1* ó *elav/RNAi/DN-Frq1/DN-Frq2*). Los resultados obtenidos demuestran que la anulación funcional de Frq mediante la

expresión de las construcciones DN produce una disminución significativa en la *quantal content* por sinapsis en ambos tipos de botones (**Fig. R-22B,C**). Sin embargo, cabe resaltar el ligero descenso en el número de sinapsis por botón obtenido en la línea *elav/RNAi/DN-Frq1/DN-Frq2* con respecto a su control, lo que produce que la estimación de la liberación por sinapsis en botones de tipo Ib no sea significativamente distinta a sus controles. Por lo tanto, en este único caso, es posible que el descenso en el número de sinapsis por botón, influya en la cantidad de liberación por botón. Podemos concluir que Frq esta regulando la cantidad de vesículas que se liberan en respuesta a un estímulo en cada sinapsis.

7. EFECTO DE LA APLICACIÓN AGUDA DE FRQ^{DN} SOBRE LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR.

Los fenotipos fisiológicos que acabamos de describir podrían deberse a efectos secundarios producidos por el incremento o la falta de función de Frq de forma crónica durante el desarrollo y no a un efecto directo sobre la liberación de neurotransmisor. Con objeto de esclarecer este hecho se calculó el *quantal content* en botones de tipo Ib, cuando las motoneuronas son cargadas con el péptido sintético Frq1^{DN}. A diferencia del sistema UAS/Gal4, las motoneuronas de las NMJ larvarias se “rellenan” con el péptido sintético DN (de *Drosophila* o mamíferos) unos minutos antes de realizar los registros. Como se observa en la **Fig. R-23A**, este tratamiento produce la internalización del péptido sintético en la motoneurona. En los casos en los que no se utiliza el péptido-DN unido al fluoróforo, la internalización se visualiza mediante el uso del colorante *texas red* (TR). La presencia del péptido DN en el terminal presináptico produce un fuerte descenso de la liberación de neurotransmisor en los botones analizados (tipo Ib). Por el contrario las muestras que no han sido tratadas con el péptido DN o muestras incubadas con el péptido NCS1 “barajado” (que contiene los mismos aminoácidos que el DN-Frq1 pero en un orden aleatorio) no muestran alteraciones en la liberación (**Fig R-23B,C**). Estos resultados nos permiten afirmar que Frq regula la liberación de neurotransmisor de forma directa.

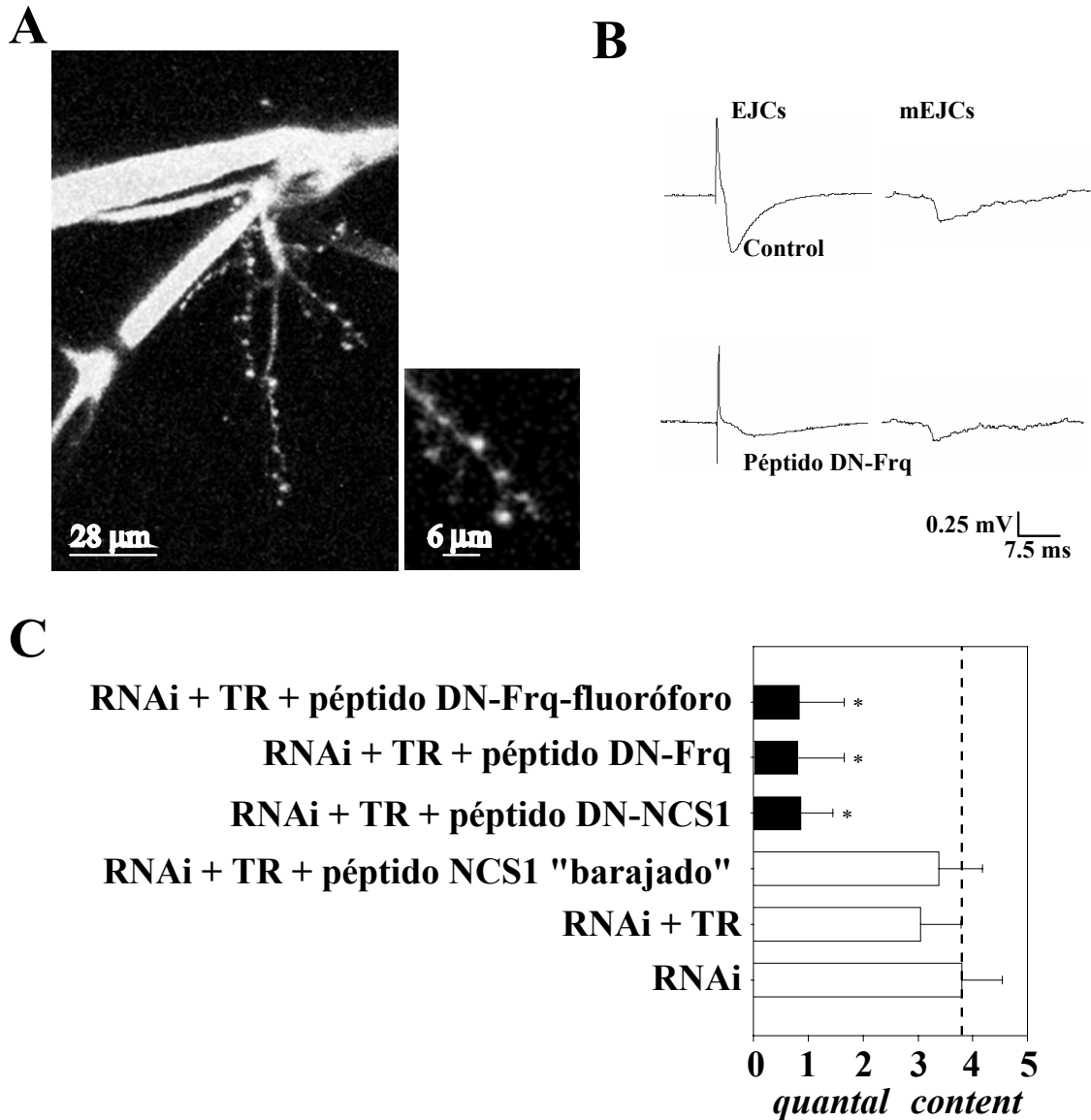


Figura R-23. Efectos de la incubación aguda del péptido sintético DN-Frq sobre la liberación de neurotransmisor. **A)** Nervio segmental relleno con el péptido DN-Frq unido a un fluoróforo para su visualización mediante microscopía de fluorescencia. En la esquina inferior se muestra un detalle de los botones que inervan las fibras 6/7 donde se realizaron los registros. **B)** Trazas representativas de los registros extracelulares realizados en botones Ib de individuos hipomorfos control (incubados con el péptido-DN "barajado") o con el péptido DN-Frq1. EJC = corrientes postsinápticas evocadas, mEJC = corrientes postsinápticas espontáneas. **C)** Histograma representando el *quantal content* de botones Ib en las distintas condiciones experimentales. Los controles se representan en blanco y las muestras tratadas con los péptidos DN-Frq1 o DN-NCS1 se representan en negro. TR = texas red. Barra de error = \pm SD. (*) = $p < 0,01$. N= 5.

8. ANÁLISIS DE INTERACCIONES GENÉTICAS

Este análisis ha tenido por objetivo buscar posibles moléculas diana de Frq1 y Frq2. Se ha medido la viabilidad de individuos que presentan alterados los niveles de Frq1 o Frq2 y los de otros genes que, por los datos disponibles en la literatura, podrían ser candidatos.

8.1 Interacción entre Frq y Fosfatidil-Inositol-4-Quinasa- β (PI-4K β). Una de las primeras interacciones moleculares que se identificaron con Frq fue la isoforma homóloga en levaduras de la PI-4K β ; PIK1. (Hendricks et al., 1999; Huttner et al., 2003). Tras su descubrimiento en este organismo, esta interacción se ha confirmado *in vitro* en diversos estudios realizados en células de mamíferos (Rajebhosale et al., 2003; Taverna et al., 2002; Weisz et al., 2000). En *Drosophila* el gen que codifica PI-4K β es *four-wheel-drive* (*fwd*). Gracias a la cesión de los alelos mutantes para este gen; *fwd3* y Df(3L)7C por parte de la Dra. Julie A. Brill, pudimos analizar el efecto de la sobreexpresión o disminución de Frq1 y/o Frq2 en la viabilidad de individuos con distinta dosis para *fwd*. Se sabe que *fwd* en homocigosis es letal. Así, testamos si dicha letalidad era rescatada mediante el exceso o el defecto de Frq1 y/o Frq2. Los datos obtenidos se resumen en la **Tabla 8**. En ninguna de las condiciones ensayadas observamos un aumento de la viabilidad de individuos homocigotos para *fwd*. Tampoco se observaron alteraciones de la viabilidad al analizar distintos alelos de *fwd* en heterocigosis con alelos de exceso o falta funcional de Frq1 o Frq2. Aunque la falta de fenotipos en las combinaciones alélicas probadas no es suficiente para descartar una interacción entre Frq y PI4K β , nuestros datos concuerdan con los obtenidos por el laboratorio de la Dra. Julie A. Brill, en donde no han obtenido ninguna interacción entre estas dos proteínas mediante ensayos de Doble Híbrido en levaduras (comunicación personal).

Tabla 8. Efectos de la alteración de *frq1* o *frq2* sobre los alelos de *fwd*.

Frq	PI4K β	Fenotipo
<i>elav-Gal4</i> / UAS-Frq1	<i>fwd3</i> / Df (3L)7C	Viabiles
<i>elav-Gal4</i> / UAS-Frq2	<i>fwd3</i> / Df (3L)7C	Viabiles
<i>elav-Gal4</i> / UAS-<i>frq</i>^{RNAi}	Df (3L)7C / Df (3L)7C	Letal
<i>elav-Gal4</i> / UAS-<i>frq</i>^{RNAi}	Df (3L)7C / <i>fwd3</i>	Viabiles
<i>elav-Gal4</i> / UAS-<i>frq</i>^{RNAi}	Df (3L)7C / +	Viabiles
<i>elav-Gal4</i> / UAS-Frq1	<i>fwd3</i> / <i>fwd3</i>	Letal
<i>elav-Gal4</i> / UAS-Frq2	<i>fwd3</i> / <i>fwd3</i>	Letal
<i>elav-Gal4</i> / UAS-DN-Frq1	<i>fwd3</i> / +	Viable
<i>elav-Gal4</i> / UAS-DN-Frq2	<i>fwd3</i> / +	Viable
<i>PBac</i> {(<i>w</i> ⁺), <i>frq2</i> [f06131]} / +.	<i>fwd3</i> / +	Viable
<i>PBac</i> {(<i>w</i> ⁺), <i>frq2</i> [f06131]} / +.	Df (3L) 7C / +	Viable

8.2 Interacción de Frq con los canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje. Los efectos electrofisiológicos detectados en las condiciones de exceso o falta de función de ambas Frqs indican que estas proteínas regulan la liberación de neurotransmisor. Sin duda la regulación de la entrada de Ca²⁺ al terminal presináptico es clave en este proceso. Esta entrada se lleva a cabo a través de los canales de Ca²⁺ que se encuentran en las zonas activas de las sinapsis. En *Drosophila*, *cacophony* (*cac*) es el homólogo para la subunidad $\alpha 1A$ (Littleton and Ganetzky, 2000; Smith et al., 1996), este canal se localiza en las zonas activas y su función es crucial para la liberación de neurotransmisor (ver Introducción). Por otro lado, se ha descrito que NCS1 es capaz de regular canales de Ca²⁺ tipo N en la NMJ de *Xenopus* (Wang et al., 2001) y de tipo P/Q en preparaciones de tallo cerebral de ratas (Tsujiimoto et al., 2002). Así pues quisimos comprobar si la alteración de los niveles de Frq1 o Frq2 producía algún fenotipo cuando ocurrían bajo situaciones de exceso o reducción en los niveles de *cac*. Para ello utilizamos las siguientes cepas de moscas; *l(1) L13 HC129*, *l(1) L13²⁰⁻³*, *Df(1) HF368* y *UAS-cac1-GFP* (cedidas amablemente por el Dr. Richard Ordway). Las distintas condiciones que se generaron de exceso y falta de función de *cac*, *frq1* o *frq2* se resumen en la **Tabla 9**. Los resultados obtenidos muestran un descenso del 50% en la viabilidad de individuos

dobles heterocigotos para la inserción PBac (w^+) $frq2^{f06131}$ (que anula $frq2$ y disminuye $frq1$; ver **Fig R-10C**), y la mutación $l(1)L13\ HC129$. Lo que sugiere una interacción funcional de frq y cac . A pesar de ello, es necesaria su confirmación bioquímica ya que hasta el momento sólo se observa exclusivamente con determinados alelos de cada gen.

Tabla 9. Efectos de la alteración de $frq1$ o $frq2$ sobre los alelos de cac .

<i>frq</i>	<i>cac</i>	Fenotipo
<i>elav</i> -Gal4 / UAS-Frq1	UAS-cac-GFP / +	Viabiles, vuelan
<i>elav</i> -Gal4 / UAS-Frq2	UAS-cac-GFP / +	Viabiles, vuelan
<i>deelav</i> -Gal4 / UAS-Frq1	$l(1)L13\ HC129$ / +	Viabiles, vuelan
<i>elav</i> -Gal4 / UAS-Frq2	$l(1)L13\ HC129$ / +	Viabiles, vuelan
<i>elav</i> -Gal4 / UAS- frq^{RNAi}	Df(1) HF368 / +	Viabiles, vuelan
<i>elav</i> -Gal4 / UAS- frq^{RNAi}	$l(1)L13\ HC129$ / +	Viabiles, vuelan
<i>elav</i> -Gal4 / UAS-DN-Frq1	$l(1)L13\ HC129$ / +	Viabiles, vuelan
<i>elav</i> -Gal4 / UAS-DN-Frq2	$l(1)L13\ HC129$ / +	Viabiles, vuelan
<i>elav</i> -Gal4 / UAS- frq^{RNAi}	$l(1)L13^{20-3}$ / +	Viabiles, vuelan
w, PBac (w^+) $frq2^{f06131}$ / +	$l(1)L13\ HC129$ / +	Viabilidad ↓ 50%
w, PBac (w^+) $frq2^{f06131}$ / +	$l(1)L13^{20-3}$ / +	Viabiles, vuelan

8.3 Interacción de Frq con los canales de K^+ de tipo A. Otro componente que participa en la regulación de la liberación de neurotransmisor son las corrientes de K^+ de tipo A. Se sabe que estas corrientes participan en la repolarización de la membrana tras la llegada del potencial de acción, contribuyendo de esta manera a la modulación de la cantidad de neurotransmisor que se libera (Shimahara, 1983). El gen *shaker* (*Sh*) de *Drosophila* codifica canales de K^+ de tipo A dependientes de voltaje. Mutaciones en este gen producen defectos o la ausencia total de las corrientes de K^+ de tipo A (Gisselmann et al., 1989; Salkoff and Wyman, 1981). Además, estudios más recientes han demostrado que Frq/NCS1 regula la presencia y la actividad de este tipo de canales en membrana (Nakamura et al., 2001; Poulain et al., 1994). Aquí, analizamos los efectos de la alteración de los niveles de $frq1$ y $frq2$ sobre individuos con niveles reducidos de *Sh*. Para ello, usamos la cepa mutante *ff*, Sh^{l4} , *os* / *FM6*. La mutación Sh^{l4} ,

es un alelo nulo funcional (Mallart et al., 1991). Las combinaciones que se han probado entre este alelo y el exceso / falta de función de una u otra Frq se esquematizan en la **Tabla 10**. No se han detectado efectos en la viabilidad de los individuos generados, sin embargo hemos observado que el aumento en los niveles de Frq1 o Frq2 sobre heterocigotos para *Sh*¹⁴ parece incrementar el temblor descrito como fenotipo característico de estos mutantes (Ferrus et al., 1990), lo que sugiere una interacción entre los productos de ambos genes.

Tabla 10. Efectos de la alteración de Frq1 y Frq2 sobre el fenotipo *Sh*¹⁴.

Frq	Sh	Fenotipo
D42-Gal4 / UAS-Frq1	<i>ff, Sh</i> ¹⁴ , <i>os</i> / +	Viable. ↑ Temblor.
D42-Gal4 / UAS-Frq2	<i>ff, Sh</i> ¹⁴ , <i>os</i> / +	Viable. ↑ Temblor.
<i>tub</i> -Gal4 ^{LL7} / UAS RNAi	<i>ff, Sh</i> ¹⁴ , <i>os</i> / +	Viable.

8.4 Interacción de Frq con la maquinaria de liberación de vesículas sinápticas. En este apartado buscamos interacciones entre las distintas líneas generadas para los genes *frq* y líneas que poseen mutaciones o inserciones de vectores derivados de elementos P en genes que participan en la maquinaria de exocitosis de vesículas sinápticas. Aquí, hemos usado las cepas que afectan a los genes: *syntaxin 1A* (*syn1A*) (Schulze et al., 1995); *synaptobrevin* (*syb*) (Stewart et al., 2001); *csp* (cystein string protein) y *synaptotagmin* (*syt*) (Broadie et al., 1994). Todas estas proteínas participan en la liberación de vesículas sinápticas (ver introducción). Ensayamos si los niveles de Frq1 o Frq2 afectan a la viabilidad de individuos que ya poseen alteraciones en alguno de estos genes. En la **Tabla 11** se muestran los genotipos analizados así como los fenotipos obtenidos en cada caso. La reducción en los niveles de ambas Frq mediante el uso de RNAi, no afecta a la viabilidad de individuos heterocigotos para las mutaciones en estos genes. Además, debido al papel descrito para Syt como responsable de la fusión de la vesícula a la membrana presináptica en respuesta a la entrada de Ca²⁺, nos preguntamos si un exceso de Frq1 o Frq2 era capaz de cubrir los requerimientos de Syt en un mutante homocigotico para este gen. Los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de Frq1 o Frq2 no rescata la letalidad de mutantes homocigotos para *syt*.

Tabla 11. Efectos de la reducción de los niveles de Frq1 y Frq2 sobre mutantes de genes que participa en la liberación de vesículas sinápticas.

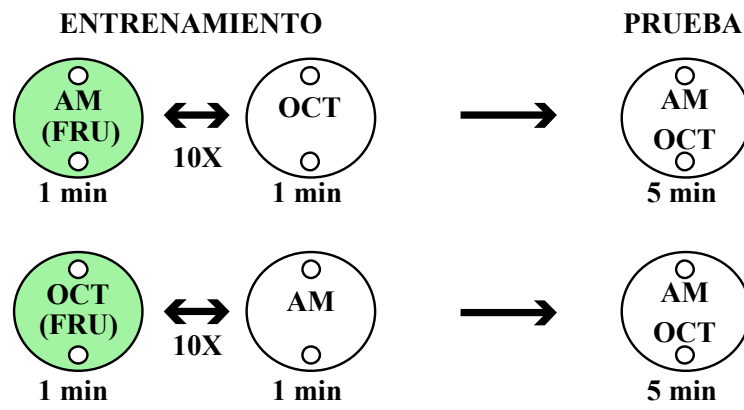
<i>Frq</i>	<i>Syx 1A</i>	Fenotipo
<i>elav-Gal4 / UAS-RNAi</i>	<i>syx</i> ^{Δ229} / +	Viables. Vuelan.
Frq	Syb	Fenotipo
<i>elav-Gal4 / UAS-RNAi</i>	P [lacZ <i>syb</i> ^{k07703}] / +	Viables. Vuelan.
Frq	Csp	Fenotipo
<i>elav-Gal4 / UAS-RNAi</i>	P [lacZ <i>csp</i> ⁰³⁹⁸⁸] / +	Viables. Vuelan.
Frq	Syt	Fenotipo
<i>elav-Gal4 / UAS-RNAi</i>	<i>Syt</i> ^{AD4} / +	Viables. Vuelan.
<i>elav-Gal4 / UAS-Frq1</i>	<i>Syt</i> ^{AD4} / <i>Syt</i> ^{AD4}	Letal
<i>elav-Gal4 / UAS-Frq2</i>	<i>Syt</i> ^{AD4} / <i>Syt</i> ^{AD4}	Letal

9. FENOTIPOS DE COMPORTAMIENTO.

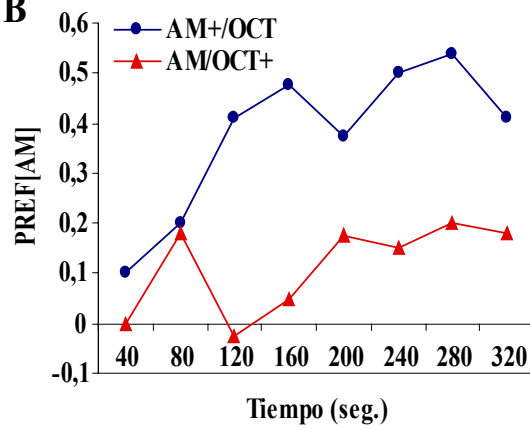
En los apartados anteriores hemos demostrado que Frq1 y Frq2 modulan la liberación de vesículas sinápticas en las motoneuronas larvarias. Además, los resultados obtenidos indican que ambas proteínas también regulan procesos de neuritogénesis en este sistema celular. La modulación de la *fuerza sináptica* así como de la morfología sináptica, son parámetros que afectan la respuesta final de comportamiento. En este apartado describimos los resultados obtenidos al estudiar fenómenos de aprendizaje o de comportamiento en individuos en los que los niveles de Frq1 y/o Frq2 han sido alterados.

9.1 Efectos de Frq1 y Frq2 en el aprendizaje asociativo larvario. El aprendizaje asociativo es crucial en todo el reino animal, un ejemplo es el condicionamiento Pauloviano que les permite predecir la aparición de comida, depredadores, pareja social o cambios de las condiciones medioambientales.

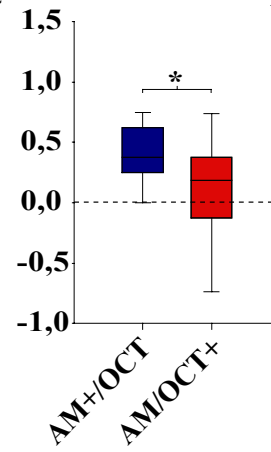
A



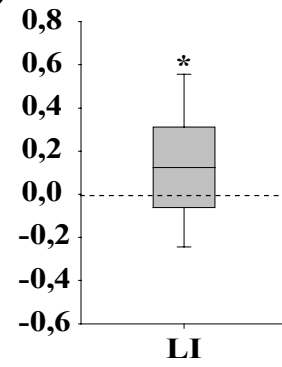
B



C



D



E

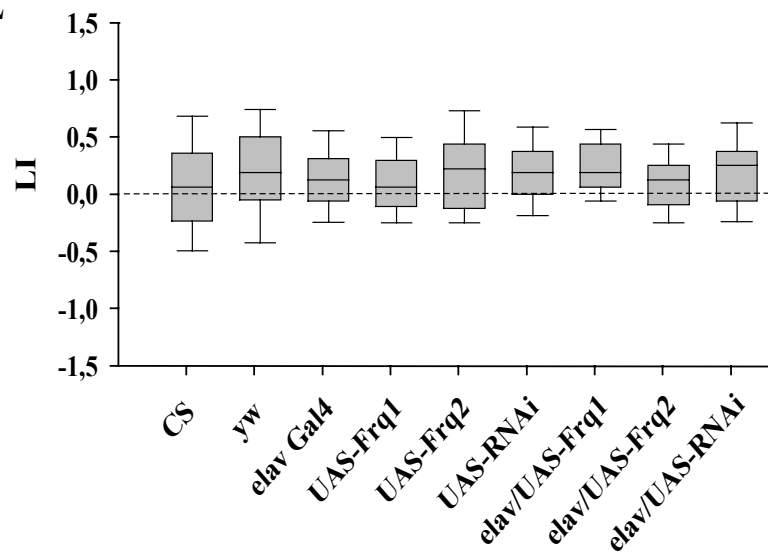


Figura R-24. Frq1 y Frq2 no regulan el aprendizaje asociativo en larvas. **A)** Esquema del protocolo de entrenamiento y test de aprendizaje. El entrenamiento consiste en 10 rondas alternadas de un minuto cada una, en donde primero se presenta un olor (AM) asociado a un refuerzo gustativo positivo (FRU) y posteriormente el otro olor (OCT) sin refuerzo. Tras el entrenamiento se realiza la prueba de comportamiento, en donde a las larvas se les presentan los dos olores en la misma placa sin ningún refuerzo gustativo y se dejan mover libremente durante 5 min. **B)** Valores de preferencia al AM de larvas control (*elav-Gal4*) durante el test. Los valores de $PREF_{AM}$ se calculan cada 20 seg y son representados. Obsérvese cómo la preferencia por el AM es siempre superior y creciente con el tiempo, en individuos que son entrenados usando el protocolo (AM+/OCT) frente a los que fueron entrenados de la forma (OCT+/AM). **C)** Los valores de preferencia media al AM son significativamente superiores en individuos entrenados como (AM+/OCT) que en los que se realizó un entrenamiento (OCT+/AM), indicando que sí hay aprendizaje asociativo. (*) = $P < 0,01$ test *t-Student* (muestras no apareadas). $N = 40-60$. **D)** Representación de los valores de LI obtenidos para cada pareja de animales que se entrenan de forma simultánea y en las condiciones contrarias (AM+/OCT) y (OCT+/AM). El valor obtenido es significativamente superior a cero, con lo que se produce aprendizaje asociativo. **E)** Valores de LI obtenidos en condiciones de exceso o reducción de Frq1 y Frq2. En ningún caso se obtienen diferencias significativas con respecto a los controles. (*) = $P < 0,001$. La representación de los valores en las figuras C-E se ha hecho mediante cajas (*box-plot*), en donde cada una representa la distribución del 50% de los valores obtenidos. La barra horizontal dentro de la caja representa el valor mediano de cada distribución. La barra de error superior representa el percentil 90 y la inferior el percentil 10.

El sistema nervioso de la larva de *Drosophila* es un sistema sencillo que permite ensayar eventos de aprendizaje asociativo de forma individual (Hendel et al., 2005; Scherer et al., 2003). Este tipo de análisis consiste en la presentación de olores (Amilacetato (AM) u Octanol (OCT)) junto con un refuerzo positivo gustativo como la Fructosa (+) o sin este refuerzo. Los test se realizan tras entrenamientos en los que la larva se expone a una estimulación olfativa (AM/+, OCT) o la contraria (AM, OCT/+) asociada a un refuerzo positivo (azúcar fructosa) (**Fig. R-24A**, Materiales y Métodos). Si el aprendizaje se lleva a cabo, las larvas tienden a elegir el olor que se presentó con el refuerzo +. Este proceso se muestra en las **Fig. R-24B-C** en donde larvas control, seleccionan preferentemente el olor AM cuando han sido entrenadas previamente con este olor asociado a fructosa. Mientras que cuando no existe este refuerzo positivo, los niveles de preferencia frente al AM son menores. El grado de aprendizaje (LI) lo calculamos mediante la fórmula; $PREF_{AM}(AM/+, OCT) - PREF_{AM}(OCT/+, AM) / 2$, de tal forma que los valores mayores que 0 indican un aprendizaje asociativo (**Fig. R-24D**). Para comprobar si la sobre-expresión o reducción de Frq1 o Frq2 provoca algún efecto en este proceso, las construcciones UAS-Frq1, UAS-Frq2 y UAS-RNAi se expresaron en el sistema nervioso central de larvas de tercer estadio usando la cepa *elav-Gal4*^{C155}. Como controles se hicieron experimentos con las cepas CS, y *w* y las líneas parentales UAS o *elav-Gal4*^{C155}. Los resultados obtenidos demuestran que la alteración en los

niveles de Frq mediante estas herramientas no produce cambios significativos en el LI (**Fig. R-24E**). Estos resultados sugieren que Frq no está regulando procesos de aprendizaje asociativo entre estímulos olfativos y gustativos en estadios larvarios.

9.2 Efectos de *Frq1* y *Frq2* en el comportamiento locomotor de adultos. Como en la mayoría de los animales, la actividad locomotora juega un papel crucial en todos los comportamientos de *Drosophila*. De esta forma, procesos tan distintos como el comportamiento durante la búsqueda de pareja, ritmo circadiano o eventos de aprendizaje y memoria, requieren del uso del centro locomotor en algún momento de su desarrollo (Martin, 2003). En este trabajo hemos usado la arena de Buridan para analizar distintos parámetros de la actividad locomotora de individuos con los niveles o la función de *frq1* o *frq2* alterados. Esta prueba fue desarrollada por Götz en 1980 y desde entonces se ha usado en estudios de locomoción en *Drosophila* (Strauss and Heisenberg, 1993; Strauss and Pichler, 1998). El movimiento de moscas adultas de tres a cinco días de edad es registrado por una cámara de video. Su posterior análisis mediante el uso del software “Buridan Data Evaluation” desarrollado por el Dr R. Wolf (Universidad de Würzburg) permite la cuantificación de diferentes parámetros como; velocidad, longitud, tiempo de actividad, linealidad etc. Para dirigir la expresión de las construcciones UAS, se usó la línea *elav-Gal4* que se expresa de forma general en el cerebro de adultos. Los resultados obtenidos indican un cambio en algunos de los parámetros analizados cuando los niveles de expresión o la función de Frq1 o Frq2 son alterados. Así, la expresión de los péptidos DN-Frq1 o DN-Frq2, produce un descenso en la velocidad media (en mm/seg: Control = $20,70 \pm 0,56$; *elav-Gal4*/DN-Frq1 = $17,45 \pm 0,84$ y *elav-Gal4*/DN-Frq2 = $17,36 \pm 0,45$). Por el contrario, la sobreexpresión de Frq1 o Frq2 no produce cambios en este parámetro (**Fig. R-25A**). Además observamos que las líneas DN-Frq1 y DN-Frq2 disminuyen la longitud que recorren: $7265,76 \pm 748,67$ mm $6420,48 \pm 813,49$ mm para DN-Frq1 y DN-Frq2 respectivamente, frente a $9567,54 \pm 317,46$ mm de los controles. Este efecto probablemente se deba al descenso de la velocidad indicado anteriormente. Por otro lado, al analizar la linealidad del movimiento, observamos que la sobreexpresión de Frq produce un incremento significativo en la rectitud con la que estos individuos se desplazan de un extremo de la placa al opuesto (**Fig. R-25AB**). Los valores de unidades relativas de linealidad (UR) obtenidos para estos casos fueron: $0,77 \pm 0,026$ en Controles, $0,93 \pm 0,042$ en *elav-*

Gal4/UAS-Frq1-64C, $0,92 \pm 0,02$ en *elav-Gal4/UAS-Frq2-33C*. Sin embargo, las líneas DN no presentan diferencias significativas en este análisis.

En resumen, podemos afirmar que los niveles de actividad de Frq1 y Frq2 afectan al comportamiento locomotor, estableciendo una correlación entre los fenotipos observados a nivel celular y sus consecuencias funcionales en un sistema neuronal.

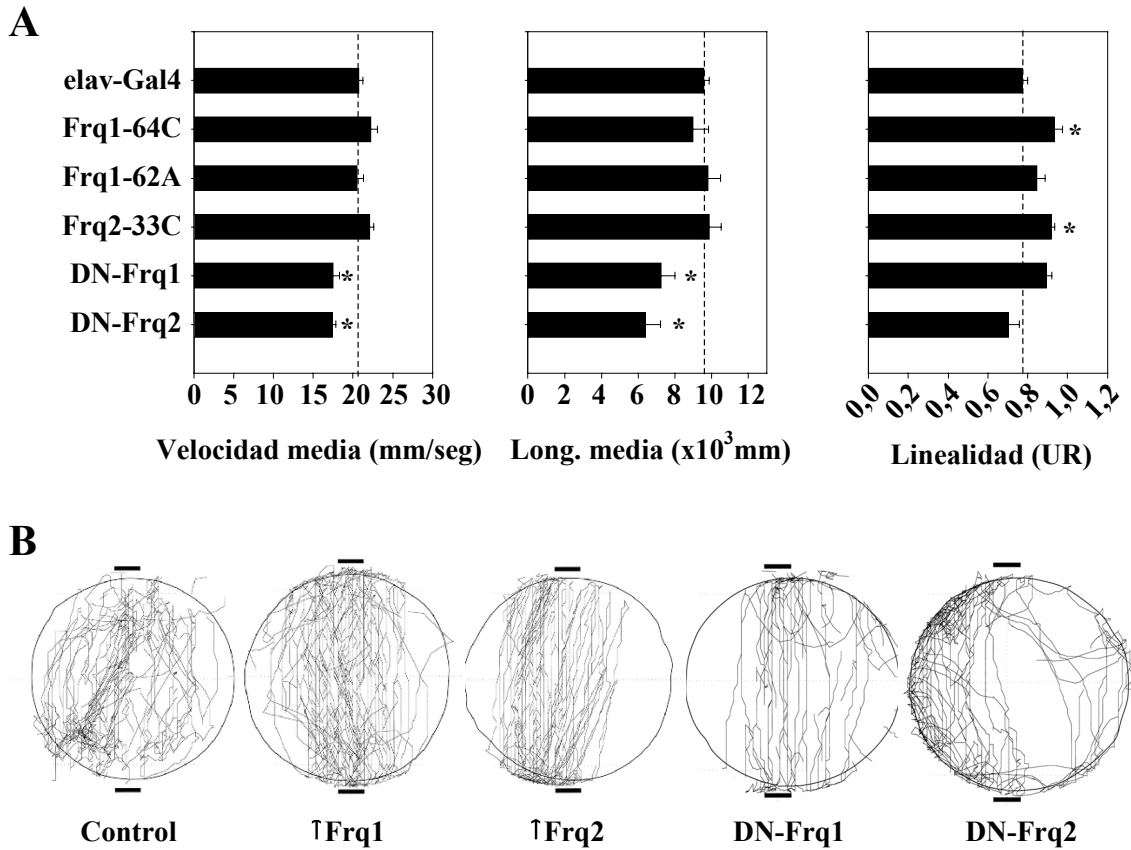


Figura R-25. Efectos de Frq1 y Frq2 en el comportamiento locomotor de adultos. A) Histogramas representando las velocidades medias, longitud media y linealidad de los genotipos analizados en la arena de Buridan. La expresión de las construcciones DN-Frq1 o DN-Frq2 produce una disminución significativa de la velocidad y la longitud media. Mientras que estos parámetros no se afectan cuando se sobreexpresan Frq1 o Frq2. Sin embargo dicha sobreexpresión produce el incremento de la linealidad con la que se mueven de una señal visual (representada por una barra horizontal en el apartado B) a la opuesta. Los valores de la linealidad se representan en Unidades Relativas (UR) y son siempre ≤ 1 . Cuando la linealidad es 1, indica que las moscas recorren una trayectoria recta desde una barra virtual a la opuesta. No existen cambios significativos al anular Frq1 o Frq2 mediante el uso de las líneas DN. **B)** Trayectorias representativas del camino recorrido por moscas **Control**; *elav-Gal4*, **↑Frq1**; *elav-Gal4/UAS-frq1*, **↑Frq2**; *elav-Gal4/UAS-frq2*, **DN-Frq1**; *elav-Gal4/UAS-DNFrq1* y **DN-Frq2**; *elav-Gal4/UAS-DNFrq2*. N = 9-14. (*) indica $P < 0,05$.

DISCUSIÓN

1. MANTENIMIENTO DE LA DUPLICACIÓN DE *Frq*.

En este trabajo hemos identificado el gen *frq2*, cuyo producto posee una identidad de secuencia del 95% con el codificado en *frq1*. Ambos genes se encuentran localizados en tandem (**Fig. R-1**), lo que indicaría un origen por duplicación. Además, observamos que ambas copias de la duplicación se conservan con el mismo grado de similitud en las distintas especies de *Drosophila* analizadas (**Fig. R-3**). Esto hace preguntarnos cómo se han mantenido ambas copias a lo largo de la evolución. Normalmente, cuando aparece una duplicación, la copia con una menor tasa de mutación se conserva, manteniendo la función original, mientras que la otra copia acumula mutaciones que acabarán por producir la pérdida de función del gen (pseudogenización) o, alternativamente pero mucho menos frecuente, provocando la aparición de una nueva función adaptativa (neogenización) (Onho, 1970). Sin embargo, estudios recientes sugieren que este modelo no es capaz de explicar la proporción existente de casos de duplicación génica en donde se han conservado ambas copias, si bien con mayor o menor tasa de divergencia. Así pues, han surgido otros modelos para explicar la conservación de genes duplicados. Un ejemplo es el modelo de Duplicación-Degeneración-Complementación (DDC) en donde las dos copias del gen acumularían mutaciones degenerativas, pero que al revés que en el modelo clásico, facilitarían el mantenimiento de ambas copias. Este modelo, representado en la **Fig. D1**, asume que las mutaciones producen una subfuncionalización del gen ancestral, bien a nivel del patrón de expresión o de la función, de tal forma que ambas copias se complementan recíprocamente (Force et al., 1999).

Aquí, hemos demostrado que *frq1* y *frq2* se expresan de forma específica en el sistema nervioso y que lo hacen principalmente en estadios embrionarios, larvarios y adultos (**Figs. R-5, R-6 y R-7**). Sin embargo, ambos genes difieren en sus niveles cuantitativos de expresión, de tal forma que *frq1* es más abundante que *frq2* en todo el desarrollo, pero sobre todo en estadios embrionarios y larvarios (**Fig. R5**). Curiosamente nuestros resultados son similares a los obtenidos para la expresión de los co-ortólogos de *frq* en el pez cebra (Blasiolo et al., 2005). En este organismo, *ncs1a* se expresa más temprano y de forma más abundante durante el desarrollo embrionario que *ncs1b*. De igual forma, *ncs1a* parece ser más abundante que *ncs1b* en el cerebro de adultos (Blasiolo et al., 2005). Aunque sería necesario un estudio más detallado de los patrones de expresión de ambos genes en *Drosophila*, los cambios cuantitativos

obtenidos, y los datos disponibles para el caso de *Danio*, parecen indicar que al menos una causa del mantenimiento de los parálogos en estas dos especies, ocurre por una subfuncionalización debida a expresiones complementarias de los dos genes.

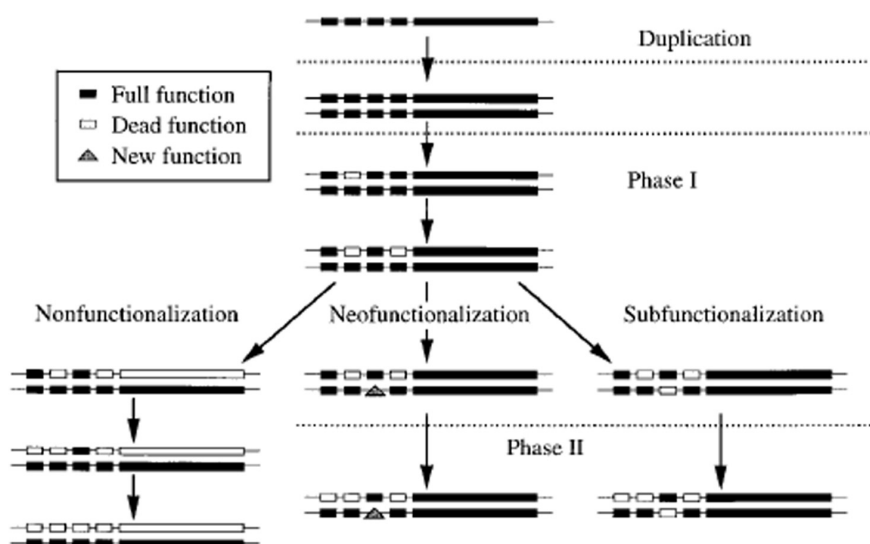


Figura D-1 Modelo DDC para el mantenimiento de genes duplicados. El esquema representa los tres destinos potenciales para genes duplicados con regiones reguladoras múltiples. Las cajas pequeñas representan elementos reguladores, mientras que las cajas grandes indican la unidad de transcripción. Las cajas en negro representan las zonas intactas del gen, mientras que las cajas blancas representan mutaciones nulas y los triángulos aparición de una nueva función. Se esquematiza el estado de un único gameto. Tras la duplicación de la zona génica, una de las copias adquiere mutaciones nulas en dos elementos reguladores. En el esquema de la izquierda se muestra el proceso de pseudogenización en el que tras acumular más mutaciones nulas se pierde la función de la copia de arriba, lo que origina el mantenimiento de la otra copia. En el esquema de la derecha (subfuncionalización), la copia de abajo adquiere una mutación nula en un elemento regulador que se mantiene intacto en la copia de arriba, con lo que al ser necesarias los dos miembros para la expresión completa se preservan ambos. En el panel central (neofuncionalización) uno de los elementos reguladores adquiere una mutación que genera una nueva función de la copia de abajo. Si la mutación nueva ocurre a expensas de otra función esencial que conserva la copia de arriba, entonces ambos miembros son preservados evolutivamente. Tomado de Force y col. 1999.

Por otro lado, al igual que para las zonas reguladoras, la subfuncionalización podría ocurrir en las zonas codificantes de la proteína si las mutaciones de pérdida o aparición de una nueva función ocurren en subdominios estructurales o funcionales de la proteína. Dada la gran variedad de funciones descritas para Frq/NCS1 (Zucker, 2003) podría ocurrir que alguno de los cambios existentes entre Frq1 y Frq2 eliminara una función determinada en una de las copias y la preservara en la otra y al revés para otra

función. De esta forma, ambos genes quedarían fijados evolutivamente, ya que sería necesaria la presencia de ambas proteínas para realizar la función completa del ancestro.

2. Frq1 y Frq2 REGULAN LA LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISOR.

Hemos demostrado que Frq1 y Frq2 regulan la liberación de neurotransmisor. Así la sobreexpresión de Frq1 y/o Frq2 en motoneuronas larvarias, produce un incremento en la respuesta global de la célula postsináptica (incremento en la amplitud de los EJPs mostrado en la **Fig. R-14**). Sin embargo, este incremento parece no estar producido por un aumento en la repuesta postsináptica producida por cada vesícula liberada (*quantal size*), ya que no se observan cambios en la amplitud de la liberación espontánea (mEJPs en la **Fig. R-14**). Para profundizar en las causas de este resultado, decidimos analizar la cantidad de liberación vesicular (*mean quantal content*) que ocurre en botones de las dos motoneuronas que inervan la fibra muscular analizada; Ib o Is. Se realizaron registros focales extracelulares en ambos tipos de botones. Los resultados obtenidos usando esta técnica, demuestran que el incremento observado se debe una mayor liberación de neurotransmisor en los dos tipos de motoneuronas, ya que al sobreexpresar Frq1 y/o Frq2 se incrementa dicha tasa entre 1,4 y 2 veces (**Fig. R-15**). Finalmente, estimando la cantidad de liberación por sinapsis en cada tipo de botón, concluimos que este incremento está causado por un aumento en la liberación de neurotransmisor por sinapsis (**Fig. R-16**). Los resultados obtenidos con las líneas RNAi, indican que no existen diferencias en la liberación de neurotransmisor cuando reducimos las cantidades de ambas proteínas hasta un 60%, demostrando que las cantidades remanentes de ambas proteínas son suficientes para desarrollar la función. Sin embargo, no ocurre lo mismo cuando bloqueamos la función de Frq1 o Frq2 mediante la expresión de los dominantes negativos. En este caso el efecto es contrario a los mencionados anteriormente cuando se sobreexpresan una o las dos Frqs, es decir: la expresión de las construcciones DN-Frq1 o DN-Frq2 produce una reducción drástica de la tasa de liberación por botón y por sinapsis (**Fig.s R-20, R21 y R22**) demostrando que la función de Frq1 y Frq2 es necesaria para la correcta liberación de neurotransmisor. Cabe destacar aquí, que las herramientas usadas (UAS-Frq para el exceso de función y UAS-DN-Frq para su bloqueo) difieren en los mecanismos de acción. De esta forma, el exceso de función se produce por un aumento en la expresión de Frq1 o Frq2. Por el

contrario, el bloqueo funcional por los DN ocurre mediante competición con las Frqs endógenas por sus dianas nativas. La correlación entre los fenotipos de ambas condiciones, exceso y falta de función, indica que los efectos obtenidos se deben a alteraciones en la misma vía. Los mecanismos moleculares por los que Frq regula la liberación de neurotransmisor en *Drosophila* permanecen sin resolver, siendo nuestro principal objetivo para el futuro. Sin embargo, el análisis de nuestros resultados y los datos existentes en la literatura para otros organismos, nos permiten plantear las siguientes hipótesis que expliquen los fenotipos observados:

2.1 Frq1 y Frq2 como reguladores del tráfico vesicular. Los efectos de Frq sobre la liberación de neurotransmisor observados en este trabajo, no pueden ser explicados por sus modificaciones morfológicas. De hecho, los efectos fisiológicos y morfológicos muestran una relación inversa (ver Discusión más abajo). Sin embargo, podrían explicarse si Frq/NCS1 regulara la cantidad de componentes que están formando una sinapsis, como el número de vesículas preparadas para liberarse (*Readily Releasable Pool*; RRP), la cantidad de canales de Ca^{2+} que se encuentran anclados en la membrana presináptica o la cantidad relativa de lípidos/proteínas en las membranas de la vesícula sináptica o plasmática (Hilfiker et al 2003). En efecto, numerosas evidencias apuntan hacia un papel de Frq/NCS1 afectando a estos procesos, mediante la regulación del transporte desde el aparato de Golgi hacia la membrana plasmática, mediante su acción activadora de la PI4K β (Audhya et al., 2000; Hendricks et al., 1999; Pan et al., 2002; Walch-Solimena and Novick, 1999; Zhao et al., 2001). El transporte de lípidos y proteínas desde el Golgi a la superficie celular se lleva a cabo por vesículas transportadoras que son generadas en la red trans del Golgi (TGN) y se mueven centrífugamente, a lo largo de los microtúbulos hasta llegar a su destino en la periferia celular (Hirschberg et al., 1998; Kreitzer et al., 2003). El control de estas vesículas transportadoras lo ejercen principalmente fosfolípidos como el fosfatidil-inositol-4-fosfato (PI4P), el fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PI4,5BP) o el Diacilglicerol (DAG) (Baron and Malhotra, 2002; De Matteis et al., 2005) y proteínas que se unen a ellos como las FAPPs (Four-Phosphate-Adaptor Proteins) que, mediante su unión a PI4P, interaccionan con la proteína ARF (ADP Ribosilation Factor) regulando así el proceso de formación de estos transportadores (Godi et al., 2004). La interacción entre Frq/NCS1 y PI4K β , descrita anteriormente, así como la regulación de ARF1 por parte de Frq/NCS1 y la colocalización de ambas, apoyarían esta hipótesis (Haynes et al., 2005). Estas interacciones no han sido confirmadas hasta la fecha en *Drosophila*. Así,

en este trabajo no se ha detectado interacción genética entre las distintas líneas de *frq* y alelos mutantes para el homólogo de PI4K β (*fwd*) (**Tabla 8**). Sin embargo, la localización perinuclear observada para Frq1 y Frq2 en los experimentos de transfección transitoria de células S2 (**Fig. R-8**), coincide con la descrita en otros estudios para Frq y PI4K β , sugiriendo un posible papel de Frq en la salida de vesículas transportadoras desde el Golgi a la membrana plasmática (Bourne et al., 2001; Taverna et al., 2002). Ante esta aparente ambigüedad, es necesario realizar experimentos adicionales que clarifiquen la situación.

2.2 Frq1 y Frq2 como reguladores de la maquinaria de exocitosis. Los principales componentes que controlan la liberación de vesículas sinápticas son el complejo SNARE y la Sinaptotagmina (Syt). El complejo SNARE participa en la fusión entre la membrana vesicular y plasmática, mientras que la Syt es el sensor de Ca²⁺ que dispara dicha fusión. Sin embargo, parece cada vez más claro que este complejo no actúa sólo y que la liberación de vesículas sinápticas requiere la participación de un mayor número de moléculas (ver Sudhoff 2004, Rizo et al 2006 o Atwood and Karunanithi 2002). En este contexto, la identificación de proteínas adicionales capaces de detectar cambios en la concentración de Ca²⁺ intracelular y, como consecuencia, modificar las propiedades de la fusión vesículas - membrana, podrían explicar la variabilidad existente en la respuesta neuronal frente a la llegada de un potencial de acción (Atwood and Karunanithi, 2002). Frq/NCS1 presenta una alta afinidad por Ca²⁺ in vitro (K_m = 1 μ M según Cox y col. 1994) lo que le permitiría una respuesta en el rango de concentración existente dentro del terminal (10-100nM). Así, se ha demostrado que Frq/NCS1 controla la facilitación en la liberación de neurotransmisor, una forma de plasticidad a corto plazo (STP), en la unión neuromuscular de *Drosophila* (Pongs et al., 1993), *Xenopus* (Olafsson et al., 1995) o en cultivos de neuronas de hipocampo, posiblemente actuando como un sensor de alta afinidad por el Ca²⁺ (Sippy et al., 2003). Por otro lado, hasta la fecha sólo se han visto efectos en la liberación basal de neurotransmisor en la NMJ de *Xenopus* (Olafsson et al., 1995). En este trabajo se demuestra que Frq1 y Frq2 son esenciales para la liberación neuronal en condiciones basales, ya que la expresión en las motoneuronas de formas dominante negativas, produce la reducción drástica de la liberación. Es interesante resaltar aquí, que dicha reducción ocurre igualmente al incubar las uniones neuromusculares de la larva con el péptido DN de Frq, así como con el péptido DN del ortólogo en mamíferos; NCS1 (**Figs. R-18 y R-23**). Este resultado sugiere que el fenotipo se produce por efectos

rápidos sobre la maquinaria de liberación vesicular y no por efecto de la disminución en el número de sinapsis por botón observada en las líneas que expresan el péptido durante todo el desarrollo (**Fig. R-19**). De esta forma, parece ser que Frq/NCS1 podría mediar la liberación basal de neurotransmisor en unas sinapsis y/o la facilitación en otras, probablemente mediante la regulación de componentes distintos de la maquinaria de exocitosis aún por identificar.

Un mecanismo por el que Frq puede regular la maquinaria de liberación vesicular, es a través de su unión y activación de la PI4K β , lo que produciría un cambio en los niveles de PI4,5BP. Estudios recientes sugieren que la síntesis de novo de PI4,5BP es necesaria para el proceso de *priming* entre las vesículas sinápticas y la membrana plasmática (Cremona O., 2001; Osborne et al., 2001; Wiedemann et al., 1998). Con lo que la presencia o ausencia de Frq en el terminal presináptico podría regular la competencia de las vesículas sinápticas para ser liberadas y por lo tanto la “fuerza” de la respuesta del terminal frente a un estímulo.

2.3 Frq1 y Frq2 como reguladores de la actividad de canales iónicos. Tanto la localización subcelular detectada en los ensayos de transfección transitoria (**Fig. R-8**) como datos previos existentes en *Drosophila* (Pongs et al., 1993) y en células en cultivo (Chen et al., 2001; O'Callaghan et al., 2002; Taverna et al., 2002) indican que parte de estas proteínas se localizan en la membrana plasmática. En la unión a membrana participaría el grupo miristoílo que unen en su extremo N-terminal. Así pues, sería factible que estén interaccionando y regulando canales iónicos. Además, se ha demostrado que Frq/NCS1 se sobreexpresa y activa canales de Ca²⁺ tipo-N, en respuesta a tratamientos con GDNF, produciendo potenciación a largo plazo en motoneuronas de *Xenopus* (Wang et al., 2001). También se ha demostrado que la infusión de NCS1 en las sinapsis del Cáliz de Held, produce la facilitación de corrientes de Ca²⁺ de tipo P/Q, mimetizando la facilitación inducida por actividad (Tsujimoto et al., 2002). Tanto los canales de tipo N como los de tipo P/Q se localizan en la membrana presináptica, regulan la cantidad de Ca²⁺ que entra y, consecuentemente, la fusión de vesículas sinápticas. La activación por Frq de estos canales podría explicar los fenotipos observados en este trabajo. El gen homólogo a estos canales en *Drosophila* es *cacophony* (*cac*). Hemos demostrado que individuos heterocigotos para este gen y el alelo de *frq*; PBac (*w*⁺) *frq2*^{f06131} disminuyen su viabilidad en un 50% (**Tabla 9**), indicando una interacción de ambos genes, y por lo tanto apoyando esta hipótesis.

De igual modo, otros estudios demuestran que Frq regula las corrientes de potasio de tipo A en *Drosophila* (Poulain et al., 1994) y *Xenopus* (Nakamura et al., 2001). Las corrientes de tipo A participan en la repolarización de la membrana presináptica, controlando la duración del potencial de acción y por lo tanto regulando la cantidad de neurotransmisor que se libera. Es importante resaltar que la magnitud de esta corriente es también Ca^{2+} -dependiente y que en los mutantes V7, que sobreexpresan Frq2, esta corriente I_A pierde la modulación por este catión (Poulain et al., 1994). Así pues, la acción reguladora de Frq sobre estos canales podría estar relacionada con los fenotipos observados. Otra evidencia a favor de esta hipótesis es la variación de la intensidad en el fenotipo de temblor observado cuando sobreexpresamos Frq1 o Frq2 sobre un fondo mutante para el canal de K^+ Shaker (**Tabla-10**).

3. Frq1 y Frq2 REGULAN LA MORFOLOGÍA SINÁPTICA.

Las primeras evidencias de que Frq regula la morfología de las NMJ demostraban que los mutantes V7 y los transgénicos que sobreexpresan el cDNA de Frq1 bajo el control del promotor *hsp70* presentan una disminución en el tamaño y número de ramificaciones así como en el número total de botones (Angaut-Petit et al., 1998). Estos estudios se hicieron en las motoneuronas que inervan las fibras 4, 12 y 13 de la musculatura larvaria, no distinguiendo entre los distintos tipos de botones presentes en estos músculos (Hoang and Chiba, 2001). Aquí, hemos analizado de forma detallada la morfología de las uniones neuromusculares 6/7. Demostramos que la sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce una reducción significativa en el número de botones, siendo específica de los de tipo Is (**Fig. R-13**). Debido a que los botones o varicosidades son especializaciones de la membrana en donde se acumulan las sinapsis, quisimos comprobar si el incremento observado en la liberación de neurotransmisor, era causado por un incremento en el número de sinapsis por botón. Como se muestra en la **Fig. R-16**, no existen cambios significativos en el número de sinapsis por botón entre individuos que sobreexpresan Frq y sus controles. Estos datos concuerdan con la reducción en el número total de sinapsis presentes en estos individuos (**Fig. R-17**). De esta manera podemos concluir que la sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce la reducción en el número de botones Is y, como consecuencia, una disminución en el número total de sinapsis, pero no altera el número de sinapsis por botón. Al igual que

para los fenotipos electrofisiológicos, no se observan cambios morfológicos en individuos hipomorfos para Frq1 y Frq2 (líneas RNAi), probablemente porque existe suficiente cantidad de proteína remanente para realizar la función. En cuanto al bloqueo funcional de Frq1 o Frq2 mediante las líneas DN, observamos diferencias morfológicas cuando se bloquean ambas Frqs en un fondo genético hipomorfo (**Fig. R-19**). En estos individuos existe un aumento en la superficie de inervación que corresponde con un aumento en el número de botones de tipo Is. Sin embargo no existen cambios significativos en el número total de sinapsis, lo que es explicable debido a la disminución del número de sinapsis por botón observada en ambos tipos de varicosidades (**Fig. R-22**). Curiosamente, los mutantes para la molécula de adhesión celular *fasciclina I* (*fasI*), muestran una relación entre los fenotipos electrofisiológicos y morfológicos similar a la existente en los mutantes de *frq1* y *frq2*. Los mutantes *fasI*, presentan una disminución severa en la liberación de neurotransmisor en respuesta a un estímulo, mientras que, a nivel morfológico, tienen más ramificaciones y botones. De manera inversa, la sobreexpresión de FasI produce la liberación de más vesículas en respuesta a un estímulo y presentan una menor arborización y número de botones (Zhong and Shanley, 1995).

Por otro lado, se sabe que en la NMJ de *Drosophila*, la regulación de moléculas de adhesión como Fas-II, implicadas en procesos de plasticidad a largo plazo (LTP), se lleva a cabo a través de segundos mensajeros como el cAMP. Es decir, un aumento de actividad neuronal corresponde con un incremento de Ca^{2+} intracelular, lo que produce un incremento en los niveles de cAMP mediante la activación de la Adenilato Ciclasa (AC) a través de la Ca-Calmodulina. El aumento de los niveles de cAMP produce la activación de la Proteína Quinasa A (PKA) y de su cascada de señalización, lo que termina produciendo la disminución de Fas-II, permitiendo así el crecimiento de las ramificaciones (Davis et al., 1996; Schuster et al., 1996a; Schuster et al., 1996b). Sin embargo, para Fas-II, la relación observada entre la actividad y la morfología neuronal es contraria a la observada para Frq o Fas-I (este trabajo y (Zhong and Shanley, 1995) .

La presencia de otras proteínas que regulen los niveles de cAMP, así como la identificación de otras dependientes de la PKA (como podría ser Fas-I) explicaría la relación entre actividad y morfología observada para Frq. Por ejemplo, se sabe que mutaciones en el gen de la proteína G heterotrimérica; Gsa (*dgs*), rescatan los fenotipos de exceso de ramificaciones presentes en los mutantes de hiperexcitabilidad *Sh* y *eag*,

en concordancia del papel de $G_{s\alpha}$ en la activación de la AC (Wolfgang et al., 2004). De igual forma, los mutantes *dgs* presentan defectos en la facilitación de NT en respuesta a estimulaciones a alta frecuencia (Hou et al., 2003). Es interesante anotar, sin embargo, que en ese estudio la activación de $G_{s\alpha}$ no se produce a través de los receptores de membrana acoplados a proteínas G como el receptor de Glutamato o el de Octopamina, por lo que la molécula activadora de este mecanismo permanece aún sin identificar. Surge así la hipótesis de trabajo de que la Frq podría estar involucrada en esa nueva vía de señalización dependiente de $G_{s\alpha}$.

CONCLUSIONES

1. *frq1* y *frq2* son genes duplicados en *Drosophila* que codifican proteínas con un 95% de identidad y que se engloban, a nivel filogenético, dentro de la clase A de la familia NCS. Esta duplicación se conserva invariable a lo largo de las especies de *Drosophila*, pero no fuera de este género donde se ha localizado únicamente un gen ortólogo a *frq*. En vertebrados, existe un ortólogo de *frq* en los genomas donde se ha analizado, exceptuando *Danio rerio* donde también aparecen dos parálogos del gen.
2. *frq1* y *frq2* se expresan en los mismos estadios del desarrollo: embrionario, larvarios y adulto. Cuantitativamente, *frq1* siempre presenta unos niveles de expresión superiores a los de *frq2*. A nivel subcelular ambas proteínas se localizan en el citosol, acumulándose en la zona perinuclear y de la membrana plasmática.
3. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 en motoneuronas larvarias produce la reducción específica de botones de tipo Is sin afectar los de tipo Ib. Como consecuencia, el número de sinapsis total que se forman en la NMJ de las fibras 6/7 disminuye, pero no se afecta el número de sinapsis por botón en ninguna de las dos motoneuronas.
4. El bloqueo funcional de Frq1 y Frq2 en motoneuronas larvarias, produce un incremento en el número de botones de tipo Is. Sin embargo el número de sinapsis totales no se afecta. Consecuentemente, los botones de tipo Ib y Is presentan una reducción en el número de sinapsis por botón.
5. La sobreexpresión de Frq1 o Frq2 produce un incremento significativo en los potenciales postsinápticos evocados (EJP). Este incremento se debe a un aumento del *quantal content* por sinapsis en los dos tipos de botones.
6. La expresión en motoneuronas del DN-Frq1 o DN-Frq2 produce la reducción de los potenciales evocados postsinápticos (EJP). Dicha reducción se produce por la disminución del *quantal content* por sinapsis en los dos tipos de botones.
7. La aplicación aguda con el péptido DN de Frq produce la disminución drástica del *quantal content* por botón. El mismo resultado se obtiene si se usa el DN de NCS1 lo que confirma la conservación funcional de estas proteínas entre mamíferos y *Drosophila*.
8. Frq1 y Frq2 no regulan el aprendizaje asociativo entre estímulos gustativos y olorosos en larvas de tercer estadio.

9. Frq1 y Frq2 modulan la respuesta locomotora de adultos en la arena de Buridan. Los niveles funcionales de Frq1 y Frq2 en el cerebro de los adultos, modulan la velocidad a la que caminan así como la linealidad y la longitud que recorren.

BIBLIOGRAFÍA

- An, W. F., Bowlby, M. R., Betty, M., Cao, J., Ling, H. P., Mendoza, G., Hinson, J. W., Mattsson, K. I., Strassle, B. W., Trimmer, J. S. et al.** (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature* **403**, 553-6.
- Angaut-Petit, D., Toth, P., Rogero, O., Faille, L., Tejedor, F. J. and Ferrus, A.** (1998). Enhanced neurotransmitter release is associated with reduction of neuronal branching in a *Drosophila* mutant overexpressing frequenin. *Eur J Neurosci* **10**, 423-34.
- Atwood, H. L., Govind, C. K. and Wu, C. F.** (1993). Differential ultrastructure of synaptic terminals on ventral longitudinal abdominal muscles in *Drosophila* larvae. *J Neurobiol* **24**, 1008-24.
- Atwood, H. L. and Karunanithi, S.** (2002). Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* **3**, 497-516.
- Audhya, A., Foti, M. and Emr, S. D.** (2000). Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Mol Biol Cell* **11**, 2673-89.
- Bao, H., Daniels, R. W., MacLeod, G. T., Charlton, M. P., Atwood, H. L. and Zhang, B.** (2005). AP180 maintains the distribution of synaptic and vesicle proteins in the nerve terminal and indirectly regulates the efficacy of Ca²⁺-triggered exocytosis. *J Neurophysiol* **94**, 1888-903.
- Baron, C. L. and Malhotra, V.** (2002). Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane. *Science* **295**, 325-8.
- Blanke, S. and Jackle, H.** (2006). Novel guanine nucleotide exchange factor GEFmeso of *Drosophila melanogaster* interacts with Ral and Rho GTPase Cdc42. *Faseb J* **20**, 683-91.
- Blasiolo, B., Kabbani, N., Boehmler, W., Thisse, B., Thisse, C., Canfield, V. and Levenson, R.** (2005). Neuronal calcium sensor-1 gene ncs-1a is essential for semicircular canal formation in zebrafish inner ear. *J Neurobiol* **64**, 285-97.
- Bollmann, J. H., Sakmann, B. and Borst, J. G.** (2000). Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science* **289**, 953-7.
- Bourne, Y., Dannenberg, J., Pollmann, V., Marchot, P. and Pongs, O.** (2001). Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1). *J Biol Chem* **276**, 11949-55.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Braunewell, K. H. and Gundelfinger, E. D.** (1999). Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res* **295**, 1-12.
- Broadie, K., Bellen, H. J., DiAntonio, A., Littleton, J. T. and Schwarz, T. L.** (1994). Absence of synaptotagmin disrupts excitation-secretion coupling during synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10727-31.
- Bronk, P., Wenniger, J. J., Dawson-Scully, K., Guo, X., Hong, S., Atwood, H. L. and Zinsmaier, K. E.** (2001). *Drosophila* Hsc70-4 is critical for neurotransmitter exocytosis in vivo. *Neuron* **30**, 475-88.
- Burgoyne, R. D., O'Callaghan, D. W., Hasdemir, B., Haynes, L. P. and Tepikin, A. V.** (2004). Neuronal Ca²⁺-sensor proteins: multitasking regulators of neuronal function. *Trends Neurosci* **27**, 203-9.
- Bustin, S. A.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**, 169-93.

- Bustin, S. A.** (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* **29**, 23-39.
- Buxbaum, J. D., Choi, E. K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A. C., Merriam, D. E. and Wasco, W.** (1998). Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med* **4**, 1177-81.
- Capozzi, F., Casadei, F. and Luchinat, C.** (2006). EF-hand protein dynamics and evolution of calcium signal transduction: an NMR view. *J Biol Inorg Chem* **11**, 949-62.
- Carrion, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstrom, B. and Naranjo, J. R.** (1999). DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature* **398**, 80-4.
- Catterall, W. A.** (1998). Structure and function of neuronal Ca²⁺ channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* **24**, 307-23.
- Cox, J. A., Durussel, I., Comte, M., Nef, S., Nef, P., Lenz, S. E. and Gundelfinger, E. D.** (1994). Cation binding and conformational changes in VILIP and NCS-1, two neuron-specific calcium-binding proteins. *J Biol Chem* **269**, 32807-13.
- Cremona O., D. C. P.** (2001). Phosphoinositides in membrane traffic at the synapse. *J Cell Sci* **114**, 1041-52.
- Chen, X. L., Zhong, Z. G., Yokoyama, S., Bark, C., Meister, B., Berggren, P. O., Roder, J., Higashida, H. and Jeromin, A.** (2001). Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. *J Physiol* **532**, 649-59.
- Cheung, U. S., Shayan, A. J., Boulianne, G. L. and Atwood, H. L.** (1999). Drosophila larval neuromuscular junction's responses to reduction of cAMP in the nervous system. *J Neurobiol* **40**, 1-13.
- Cho, S. H. and Cepko, C. L.** (2006). Wnt2b/ β -catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development* **133**, 3167-77.
- Chuang, C. F. and Meyerowitz, E. M.** (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4985-90.
- Davis, G. W., Schuster, C. M. and Goodman, C. S.** (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron* **17**, 669-79.
- De Matteis, M. A., Di Campli, A. and Godi, A.** (2005). The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 396-405.
- Del Castillo, J. and Katz, B.** (1954). Quantal components of the end-plate potential. *J Physiol* **124**, 560-73.
- Dietrich, D., Kirschstein, T., Kukley, M., Pereverzev, A., von der Brelie, C., Schneider, T. and Beck, H.** (2003). Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca²⁺ channels. *Neuron* **39**, 483-96.
- Evans, G. J., Morgan, A. and Burgoyne, R. D.** (2003). Tying everything together: the multiple roles of cysteine string protein (CSP) in regulated exocytosis. *Traffic* **4**, 653-9.
- Falkenburg, D., Dworniczak, B., Faust, D. M. and Bautz, E. K.** (1987). RNA polymerase II of *Drosophila*. Relation of its 140,000 Mr subunit to the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **195**, 929-37.
- Farazi, T. A., Waksman, G. and Gordon, J. I.** (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* **276**, 39501-4.

Fatt, P. and Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* **117**, 109-28.

Ferrus, A., Llamazares, S., de la Pompa, J. L., Tanouye, M. A. and Pongs, O. (1990). Genetic analysis of the Shaker gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **125**, 383-98.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.

Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. and Postlethwait, J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **151**, 1531-45.

Genin, A., Davis, S., Meziane, H., Doyere, V., Jeromin, A., Roder, J., Mallet, J. and Laroche, S. (2001). Regulated expression of the neuronal calcium sensor-1 gene during long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neuroscience* **106**, 571-7.

Gisselmann, G., Sewing, S., Madsen, B. W., Mallart, A., Angaut-Petit, D., Muller-Holtkamp, F., Ferrus, A. and Pongs, O. (1989). The interference of truncated with normal potassium channel subunits leads to abnormal behaviour in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Embo J* **8**, 2359-64.

Godi, A., Di Campli, A., Konstantakopoulos, A., Di Tullio, G., Alessi, D. R., Kular, G. S., Daniele, T., Marra, P., Lucocq, J. M. and De Matteis, M. A. (2004). FAPPs control Golgi-to-cell-surface membrane traffic by binding to ARF and PtdIns(4)P. *Nat Cell Biol* **6**, 393-404.

Gomez, M., De Castro, E., Guarin, E., Sasakura, H., Kuhara, A., Mori, I., Bartfai, T., Bargmann, C. I. and Nef, P. (2001). Ca²⁺ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans*. *Neuron* **30**, 241-8.

Gotz, K. G. (1980). Visual guidance in *Drosophila*. *Basic Life Sci* **16**, 391-407.

Grabarek, Z. (2006). Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol* **359**, 509-25.

Guo, X., Macleod, G. T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M. P., Atwood, H. L. and Zinsmaier, K. E. (2005). The GTPase dMiro Is Required for Axonal Transport of Mitochondria to *Drosophila* Synapses. *Neuron* **47**, 379-93.

Haeseleer, F., Sokal, I., Verlinde, C. L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Pronin, A. N., Benovic, J. L., Fariss, R. N. and Palczewski, K. (2000). Five members of a novel Ca(2+)-binding protein (CABP) subfamily with similarity to calmodulin. *J Biol Chem* **275**, 1247-60.

Hammond, S. M., Caudy, A. A. and Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* **2**, 110-9.

Harlow, M. L., Ress, D., Stoschek, A., Marshall, R. M. and McMahan, U. J. (2001). The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. *Nature* **409**, 479-84.

Haynes, L. P., Thomas, G. M. and Burgoyne, R. D. (2005). Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase beta and trans-Golgi network-plasma membrane traffic. *J Biol Chem* **280**, 6047-54.

Hendel, T., Michels, B., Neuser, K., Schipanski, A., Kaun, K., Sokolowski, M. B., Marohn, F., Michel, R., Heisenberg, M. and Gerber, B. (2005). The carrot, not the stick: appetitive rather than aversive gustatory stimuli support associative

olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **191**, 265-79.

Hendricks, K. B., Wang, B. Q., Schnieders, E. A. and Thorner, J. (1999). Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nat Cell Biol* **1**, 234-41.

Hilfiker, S. (2003). Neuronal calcium sensor-1: a multifunctional regulator of secretion. *Biochem Soc Trans* **31**, 828-32.

Hirschberg, K., Miller, C. M., Ellenberg, J., Presley, J. F., Siggia, E. D., Phair, R. D. and Lippincott-Schwartz, J. (1998). Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol* **143**, 1485-503.

Hoang, B. and Chiba, A. (2001). Single-cell analysis of *Drosophila* larval neuromuscular synapses. *Dev Biol* **229**, 55-70.

Hou, D., Suzuki, K., Wolfgang, W. J., Clay, C., Forte, M. and Kidokoro, Y. (2003). Presynaptic impairment of synaptic transmission in *Drosophila* embryos lacking Gs(alpha). *J Neurosci* **23**, 5897-905.

Huttner, I. G., Strahl, T., Osawa, M., King, D. S., Ames, J. B. and Thorner, J. (2003). Molecular interactions of yeast frequenin (Frq1) with the phosphatidylinositol 4-kinase isoform, Pik1. *J Biol Chem* **278**, 4862-74.

Hutvagner, G. and Zamore, P. D. (2002). RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* **12**, 225-32.

Ikura, M. and Ames, J. B. (2006). Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1159-64.

Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1976). Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol* **262**, 189-214.

Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (1982). Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2700-4.

Johansen, J., Halpern, M. E., Johansen, K. M. and Keshishian, H. (1989). Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *J Neurosci* **9**, 710-25.

Kalidas, S. and Smith, D. P. (2002). Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron* **33**, 177-84.

Kapp-Barnea, Y., Melnikov, S., Shefler, I., Jeromin, A. and Sagi-Eisenberg, R. (2003). Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase beta regulate IgE receptor-triggered exocytosis in cultured mast cells. *J Immunol* **171**, 5320-7.

Katz, B. and Miledi, R. (1965). The effect of temperature on the synaptic delay at the neuromuscular junction. *J Physiol* **181**, 656-70.

Katz, B. and Miledi, R. (1969). Spontaneous and evoked activity of motor nerve endings in calcium Ringer. *J Physiol* **203**, 689-706.

Kawamura, S. (1994). Molecular mechanism of light-adaptation in retinal photoreceptors. *Keio J Med* **43**, 149-54.

Kawasaki, F., Collins, S. C. and Ordway, R. W. (2002). Synaptic calcium-channel function in *Drosophila*: analysis and transformation rescue of temperature-sensitive paralytic and lethal mutations of cacophony. *J Neurosci* **22**, 5856-64.

Kawasaki, F., Felling, R. and Ordway, R. W. (2000a). A temperature-sensitive paralytic mutant defines a primary synaptic calcium channel in *Drosophila*. *J Neurosci* **20**, 4885-9.

Kawasaki, F., Hazen, M. and Ordway, R. W. (2000b). Fast synaptic fatigue in shibire mutants reveals a rapid requirement for dynamin in synaptic vesicle membrane trafficking. *Nat Neurosci* **3**, 859-60.

Kawasaki, F., Zou, B., Xu, X. and Ordway, R. W. (2004). Active zone localization of presynaptic calcium channels encoded by the cacophony locus of *Drosophila*. *J Neurosci* **24**, 282-5.

Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.

Kittel, R. J., Wichmann, C., Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D. A., Pawlu, C., Kellner, R. R., Willig, K. I. et al. (2006). Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* **312**, 1051-4.

Koizumi, S., Rosa, P., Willars, G. B., Challiss, R. A., Taverna, E., Francolini, M., Bootman, M. D., Lipp, P., Inoue, K., Roder, J. et al. (2002). Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **277**, 30315-24.

Kreitzer, G., Schmoranz, J., Low, S. H., Li, X., Gan, Y., Weimbs, T., Simon, S. M. and Rodriguez-Boulant, E. (2003). Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat Cell Biol* **5**, 126-36.

Kretsinger, R. H. and Nockolds, C. E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *J Biol Chem* **248**, 3313-26.

Laissue, P. P., Reiter, C., Hiesinger, P. R., Halter, S., Fischbach, K. F. and Stocker, R. F. (1999). Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **405**, 543-52.

Littleton, J. T., Barnard, R. J., Titus, S. A., Slind, J., Chapman, E. R. and Ganetzky, B. (2001). SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12233-8.

Littleton, J. T. and Ganetzky, B. (2000). Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* **26**, 35-43.

Mackler, J. M., Drummond, J. A., Loewen, C. A., Robinson, I. M. and Reist, N. E. (2002). The C(2)B Ca(2+)-binding motif of synaptotagmin is required for synaptic transmission in vivo. *Nature* **418**, 340-4.

Macleod, G. T., Hegstrom-Wojtowicz, M., Charlton, M. P. and Atwood, H. L. (2002). Fast calcium signals in *Drosophila* motor neuron terminals. *J Neurophysiol* **88**, 2659-63.

Mallart, A., Angaut-Petit, D., Bourret-Poulain, C. and Ferrus, A. (1991). Nerve terminal excitability and neuromuscular transmission in T(X;Y)V7 and Shaker mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Neurogenet* **7**, 75-84.

Marek, K. W. and Davis, G. W. (2002). Transgenically encoded protein photoinactivation (FIAH-FALI): acute inactivation of synaptotagmin I. *Neuron* **36**, 805-13.

Marin, M. C., Rodriguez, J. R. and Ferrus, A. (2004). Transcription of *Drosophila* troponin I gene is regulated by two conserved, functionally identical, synergistic elements. *Mol Biol Cell* **15**, 1185-96.

Martin-Pena, A., Acebes, A., Rodriguez, J. R., Sorribes, A., de Polavieja, G. G., Fernandez-Funez, P. and Ferrus, A. (2006). Age-independent synaptogenesis by phosphoinositide 3 kinase. *J Neurosci* **26**, 10199-208.

Martin, J. R. (2003). Locomotor activity: a complex behavioural trait to unravel. *Behav Processes* **64**, 145-160.

- Martone, M. E., Edelman, V. M., Ellisman, M. H. and Nef, P.** (1999). Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tissue Res* **295**, 395-407.
- McFerran, B. W., Graham, M. E. and Burgoyne, R. D.** (1998). Neuronal Ca^{2+} sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *J Biol Chem* **273**, 22768-72.
- McFerran, B. W., Weiss, J. L. and Burgoyne, R. D.** (1999). Neuronal Ca^{2+} sensor 1. Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca^{2+} -independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca^{2+} signal transduction. *J Biol Chem* **274**, 30258-65.
- Meinrenken, C. J., Borst, J. G. and Sakmann, B.** (2003). Local routes revisited: the space and time dependence of the Ca^{2+} signal for phasic transmitter release at the rat calyx of Held. *J Physiol* **547**, 665-89.
- Mercer, E. A., Korhonen, L., Skoglosa, Y., Olsson, P. A., Kukkonen, J. P. and Lindholm, D.** (2000). NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways. *Embo J* **19**, 3597-607.
- Morohashi, Y., Hatano, N., Ohya, S., Takikawa, R., Watabiki, T., Takasugi, N., Imaizumi, Y., Tomita, T. and Iwatsubo, T.** (2002). Molecular cloning and characterization of CALP/KChIP4, a novel EF-hand protein interacting with presenilin 2 and voltage-gated potassium channel subunit Kv4. *J Biol Chem* **277**, 14965-75.
- Mullins, M. C., Rio, D. C. and Rubin, G. M.** (1989). cis-acting DNA sequence requirements for P-element transposition. *Genes Dev* **3**, 729-38.
- Nakamura, T. Y., Pountney, D. J., Ozaita, A., Nandi, S., Ueda, S., Rudy, B. and Coetzee, W. A.** (2001). A role for frequenin, a Ca^{2+} -binding protein, as a regulator of Kv4 K^{+} -currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12808-13.
- Nakamura, T. Y., Sturm, E., Pountney, D. J., Orenzoff, B., Artman, M. and Coetzee, W. A.** (2003). Developmental expression of NCS-1 (frequenin), a regulator of Kv4 K^{+} channels, in mouse heart. *Pediatr Res* **53**, 554-7.
- O'Callaghan, D. W., Ivings, L., Weiss, J. L., Ashby, M. C., Tepikin, A. V. and Burgoyne, R. D.** (2002). Differential use of myristoyl groups on neuronal calcium sensor proteins as a determinant of spatio-temporal aspects of Ca^{2+} signal transduction. *J Biol Chem* **277**, 14227-37.
- Olafsson, P., Soares, H. D., Herzog, K. H., Wang, T., Morgan, J. I. and Lu, B.** (1997). The Ca^{2+} binding protein, frequenin is a nervous system-specific protein in mouse preferentially localized in neurites. *Brain Res Mol Brain Res* **44**, 73-82.
- Olafsson, P., Wang, T. and Lu, B.** (1995). Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca^{2+} -binding protein frequenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8001-5.
- Onho, S.** (1970). Evolution by gene duplication: Springer-Verlag.
- Osborne, S. L., Meunier, F. A. and Schiavo, G.** (2001). Phosphoinositides as key regulators of synaptic function. *Neuron* **32**, 9-12.
- Pan, C. Y., Jeromin, A., Lundstrom, K., Yoo, S. H., Roder, J. and Fox, A. P.** (2002). Alterations in exocytosis induced by neuronal Ca^{2+} sensor-1 in bovine chromaffin cells. *J Neurosci* **22**, 2427-33.
- Pilot, F., Philippe, J. M., Lemmers, C. and Lecuit, T.** (2006). Spatial control of actin organization at adherens junctions by a synaptotagmin-like protein Btsz. *Nature* **442**, 580-4.

Pongs, O., Lindemeier, J., Zhu, X. R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jentgens, I., Lambrecht, H. G., Koch, K. W., Schwemer, J., Rivosecchi, R. et al. (1993). Frequenin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron* **11**, 15-28.

Poulain, C., Ferrus, A. and Mallart, A. (1994). Modulation of type A K⁺ current in *Drosophila* larval muscle by internal Ca²⁺; effects of the overexpression of frequenin. *Pflugers Arch* **427**, 71-9.

Qin, G., Schwarz, T., Kittel, R. J., Schmid, A., Rasse, T. M., Kappei, D., Ponimaskin, E., Heckmann, M. and Sigrist, S. J. (2005). Four different subunits are essential for expressing the synaptic glutamate receptor at neuromuscular junctions of *Drosophila*. *J Neurosci* **25**, 3209-18.

Rajebhosale, M., Greenwood, S., Vidugiriene, J., Jeromin, A. and Hilfiker, S. (2003). Phosphatidylinositol 4-OH kinase is a downstream target of neuronal calcium sensor-1 in enhancing exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* **278**, 6075-84.

Rasse, T. M., Fouquet, W., Schmid, A., Kittel, R. J., Mertel, S., Sigrist, C. B., Schmidt, M., Guzman, A., Merino, C., Qin, G. et al. (2005). Glutamate receptor dynamics organizing synapse formation in vivo. *Nat Neurosci* **8**, 898-905.

Reynolds, A. J., Bartlett, S. E. and Morgans, C. (2001). The distribution of neuronal calcium sensor-1 protein in the developing and adult rat retina. *Neuroreport* **12**, 725-8.

Richmond, J. E. and Broadie, K. S. (2002). The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol* **12**, 499-507.

Rieckhof, G. E., Yoshihara, M., Guan, Z. and Littleton, J. T. (2003). Presynaptic N-type calcium channels regulate synaptic growth. *J Biol Chem* **278**, 41099-108.

Rivosecchi, R., Pongs, O., Theil, T. and Mallart, A. (1994). Implication of frequenin in the facilitation of transmitter release in *Drosophila*. *J Physiol* **474**, 223-32.

Rizo, J., Chen, X. and Arac, D. (2006). Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell Biol* **16**, 339-50.

Roberts, D. B. (1986). *Drosophila a practical approach*: IRL Press, Oxford, Washington DC.

Rong, Y. S. and Golic, K. G. (2001). A targeted gene knockout in *Drosophila*. *Genetics* **157**, 1307-12.

Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-25.

Salkoff, L. and Wyman, R. (1981). Genetic modification of potassium channels in *Drosophila* Shaker mutants. *Nature* **293**, 228-30.

Scherer, S., Stocker, R. F. and Gerber, B. (2003). Olfactory learning in individually assayed *Drosophila* larvae. *Learn Mem* **10**, 217-25.

Schulze, K. L., Broadie, K., Perin, M. S. and Bellen, H. J. (1995). Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. *Cell* **80**, 311-20.

Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S. (1996a). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. I. Fasciclin II controls synaptic stabilization and growth. *Neuron* **17**, 641-54.

Schuster, C. M., Davis, G. W., Fetter, R. D. and Goodman, C. S. (1996b). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. II. Fasciclin II controls presynaptic structural plasticity. *Neuron* **17**, 655-67.

- Schuster, C. M., Ultsch, A., Schloss, P., Cox, J. A., Schmitt, B. and Betz, H.** (1991). Molecular cloning of an invertebrate glutamate receptor subunit expressed in *Drosophila* muscle. *Science* **254**, 112-4.
- Shimahara, T.** (1983). Presynaptic modulation of transmitter release by the early outward potassium current in *Aplysia*. *Brain Res* **263**, 51-6.
- Sippy, T., Cruz-Martin, A., Jeromin, A. and Schweizer, F. E.** (2003). Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat Neurosci* **6**, 1031-8.
- Smith, L. A., Wang, X., Peixoto, A. A., Neumann, E. K., Hall, L. M. and Hall, J. C.** (1996). A *Drosophila* calcium channel $\alpha 1$ subunit gene maps to a genetic locus associated with behavioral and visual defects. *J Neurosci* **16**, 7868-79.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-7.
- Stewart, B. A., Atwood, H. L., Renger, J. J., Wang, J. and Wu, C. F.** (1994). Improved stability of *Drosophila* larval neuromuscular preparations in haemolymph-like physiological solutions. *J Comp Physiol [A]* **175**, 179-91.
- Stewart, B. A., Mohtashami, M., Zhou, L., Trimble, W. S. and Boulianne, G. L.** (2001). SNARE-dependent signaling at the *Drosophila* wing margin. *Dev Biol* **234**, 13-23.
- Strauss, R. and Heisenberg, M.** (1993). A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* **13**, 1852-61.
- Strauss, R. and Pichler, J.** (1998). Persistence of orientation toward a temporarily invisible landmark in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]* **182**, 411-23.
- Strynadka, N. C. and James, M. N.** (1989). Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* **58**, 951-98.
- Studier, J. A. and Keppler, K. J.** (1988). A note on the neighbor-joining algorithm of Saitou and Nei. *Mol Biol Evol* **5**, 729-31.
- Sudhof, T. C.** (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**, 509-47.
- Taverna, E., Francolini, M., Jeromin, A., Hilfiker, S., Roder, J. and Rosa, P.** (2002). Neuronal calcium sensor 1 and phosphatidylinositol 4-OH kinase beta interact in neuronal cells and are translocated to membranes during nucleotide-evoked exocytosis. *J Cell Sci* **115**, 3909-22.
- Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P. and Glaser, L.** (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu Rev Biochem* **57**, 69-99.
- Tsujimoto, T., Jeromin, A., Saitoh, N., Roder, J. C. and Takahashi, T.** (2002). Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science* **295**, 2276-9.
- Wagh, D. A., Rasse, T. M., Asan, E., Hofbauer, A., Schwenkert, I., Durrbeck, H., Buchner, S., Dabauvalle, M. C., Schmidt, M., Qin, G. et al.** (2006). Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron* **49**, 833-44.
- Walch-Solimena, C. and Novick, P.** (1999). The yeast phosphatidylinositol-4-OH kinase *pik1* regulates secretion at the Golgi. *Nat Cell Biol* **1**, 523-5.
- Wang, C. Y., Yang, F., He, X., Chow, A., Du, J., Russell, J. T. and Lu, B.** (2001). Ca^{2+} binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca^{2+} channels and transmitter release. *Neuron* **32**, 99-112.
- Weisz, O. A., Gibson, G. A., Leung, S. M., Roder, J. and Jeromin, A.** (2000). Overexpression of frequenin, a modulator of phosphatidylinositol 4-kinase, inhibits

biosynthetic delivery of an apical protein in polarized madin-darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **275**, 24341-7.

Welling, G. W., Weijer, W. J., van der Zee, R. and Welling-Wester, S. (1985). Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett* **188**, 215-8.

Wianny, F. and Zernicka-Goetz, M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* **2**, 70-5.

Wiedemann, C., Schafer, T., Burger, M. M. and Sihra, T. S. (1998). An essential role for a small synaptic vesicle-associated phosphatidylinositol 4-kinase in neurotransmitter release. *J Neurosci* **18**, 5594-602.

Wolfgang, W. J., Clay, C., Parker, J., Delgado, R., Labarca, P., Kidokoro, Y. and Forte, M. (2004). Signaling through Gs alpha is required for the growth and function of neuromuscular synapses in *Drosophila*. *Dev Biol* **268**, 295-311.

Wucherpennig, T., Wilsch-Brauninger, M. and Gonzalez-Gaitan, M. (2003). Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol* **161**, 609-24.

Zhai, R. G. and Bellen, H. J. (2004). The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)* **19**, 262-70.

Zhao, X., Varnai, P., Tuymetova, G., Balla, A., Toth, Z. E., Oker-Blom, C., Roder, J., Jeromin, A. and Balla, T. (2001). Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase beta stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells. *J Biol Chem* **276**, 40183-9.

Zhong, Y. and Shanley, J. (1995). Altered nerve terminal arborization and synaptic transmission in *Drosophila* mutants of cell adhesion molecule fasciclin I. *J Neurosci* **15**, 6679-87.

Zucker, R. S. (2003). NCS-1 stirs somnolent synapses. *Nat Neurosci* **6**, 1006-8.